

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Phytopathologie

Analyse der Cäsium- und Strontiumaufnahme
in *Saccharomyces cerevisiae* unter Verwendung einer
genomweiten, haploiden Mutantensammlung

Sabine Heuck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. Durner
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 26.01.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 02.04.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iv

1. Einleitung 1

1.1 Strahlung und Strahlenschutz..... 1

1.1.1 Ionisierende Strahlung – Quellen 1

1.1.2 Ionisierende Strahlung – Arten 2

1.1.3 Ionisierende Strahlung – Dosimetrie und Grenzwerte 2

1.1.4 Ionisierende Strahlung – Biologische Wirkung 3

1.2 Verbreitung von künstlichen Radionukliden in der Umwelt 4

1.2.1 Der Reaktorunfall von Tschernobyl und seine Folgen 4

1.2.2 Der Eintrag von Radiocäsium und -strontium in biologische Systeme 5

1.3 Cäsium und Strontium 7

1.3.1 Cäsium – Eigenschaften 7

1.3.2 Cäsium – Vorkommen 8

1.3.3 Cäsium – Aufnahme in Pflanzen 8

1.3.4 Strontium – Eigenschaften 10

1.3.5 Strontium – Vorkommen 10

1.3.6 Strontium – Aufnahme in Pflanzen 11

1.4 Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* 11

1.4.1 Kalium-Transport in *Saccharomyces cerevisiae* 12

 1.4.1.1 Kalium-Aufnahme 13

 1.4.1.2 K-Abgabe und intrazelluläre Verteilung 14

 1.4.1.3 Cs-Aufnahme 15

1.4.2 Calcium-Transport in *Saccharomyces cerevisiae* 15

 1.4.2.1 Ca-Homöostase 16

 1.4.2.2 Ca-Aufnahme und intrazelluläre Verteilung 16

 1.4.2.3 Sr-Aufnahme 17

1.5 Ziel der Arbeit 18

2. Material und Methoden 19

2.1 Material 19

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien 19

2.1.2 Radioaktive Chemikalien 19

2.1.3 Geräte 19

2.1.4 Oligonukleotide 20

2.1.5 Plasmide 20

2.1.6 Antikörper 21

2.1.7 E. coli-Stämme 21

2.1.8 *S. cerevisiae*-Stämme 21

2.2 Methoden 21

2.2.1 E. coli-Techniken 22

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	22
2.2.1.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	22
2.2.1.3 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	22
2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> -Techniken	22
2.2.2.1 Zellzahlbestimmung.....	22
2.2.2.2 Kultivierung von Hefen und Anlegen von Dauerkulturen	23
2.2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	23
2.2.2.4 RNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	23
2.2.2.5 Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.2.6 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.3 PCR-Techniken	25
2.2.3.1 PCR, allgemein.....	25
2.2.3.2 Kolonie-PCR.....	25
2.2.3.3 Sequenzierungsreaktionen	25
2.2.4 Western Blot	26
2.2.5 Northern Blot	26
2.2.5.1 Herstellung von DIG-markierten Sonden.....	26
2.2.5.2 RNA-Gelelektrophorese und Blotten	26
2.2.5.3 Hybridisierung und Detektion	27
2.2.6 Aufnahme-Assay für Cs, Sr, Rb und Ca	27
2.2.6.1 Standard-Assay mit Cs und Sr	27
2.2.6.2 Bestimmung der γ -Aktivität mit dem Wallac Wizard 1480	28
2.2.6.3 Kinetik-Experimente	28
2.2.6.4 Aufnahme-Assay mit Ca und Rb	29
2.2.7 Bestimmung des zellulären K- und Ca-Gehalt von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.2.8 Toxizitätstest.....	30
2.2.9 GFP-Fluoreszenz-Mikroskopie	30
2.2.10 Membranfraktionierung.....	30
2.2.11 Bioinformatik und Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Toxizität von Cs und Sr in <i>S. cerevisiae</i>.....	32
3.2 Untersuchung der Cs- und Sr-Aufnahme in Hefestamm BY4741.....	32
3.2.1 Zeitabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme.....	33
3.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme.....	34
3.2.3 Cs und Sr werden in Hefezellen angereichert	36
3.3 Analyse der Cs- und Sr-Anreicherung in 4862 Mutantenstämmen	36
3.4 Der Einfluss des pH-Milieus auf die Cs- und Sr-Anreicherung	39
3.5 Vergleichende Analyse zwischen Cs, Sr und den essentiellen Elementen K und Ca	42
3.5.1 Die Rb- und Cs-Anreicherung unterscheidet sich bei den Kandidaten	43
3.5.2 Mutanten mit Cs-Phänotyp zeigen Veränderungen im zellulären Ca- aber nicht K-Gehalt	44
3.5.3 Die Sr- und Ca-Akkumulation unterscheiden sich fast nicht	46
3.5.4 Eine veränderte Sr-Akkumulation ist oftmals mit Störungen im Ca-Haushalt assoziiert	48
3.6 Funktionelle Klassifizierung aller 212 Kandidatengene	49
3.7 Identifizierung funktioneller Proteingruppen und -komplexe	55
3.7.1 Vps-Mutanten zeigen eine gestörte Sr- und zum Teil auch Cs-Akkumulation	55
3.7.1.1 Vps-Mutanten der Klasse E.....	55

3.7.1.2 Vps-Mutanten der Klasse A, B und D	58
3.7.2 Störungen in der intrazellulären Proteinsortierung beeinflussen die Cs- Anreicherung	59
3.7.3 Die V-ATPase beeinflusst die Anreicherung von Cs maßgeblich	61
3.8 Transportproteine, die die Anreicherung von Cs und Sr beeinflussen	64
3.9 YDR090C – Portrait eines Kandidaten	66
3.9.1 Die Cs-Anreicherung in ydr090cΔ	66
3.9.2 YDR090C wird transkribiert	68
3.9.3 Die Komplementation der Mutante ydr090cΔ unterdrückt den Cs-Phänotyp	68
3.9.4 Das Protein Ydr090cp ist in der Plasmamembran lokalisiert	69
4. Diskussion	72
4.1 BY4741 toleriert hohe, extrazelluläre Cs- und Sr-Konzentrationen.....	72
4.2 BY4741 kann große Mengen an Cs und Sr anreichern.....	73
4.3 Insgesamt 212 Gene beeinflussen die Cs- und Sr-Anreicherung	75
4.3.1 Wird die Homöostase von Cs und K teilweise unterschiedlich reguliert?	76
4.3.2 Die Anreicherung von Sr und Ca unterliegt der gleichen Regulation	77
4.4 Verschiedene zelluläre Prozesse haben einen Einfluss auf die Cs- und Sr-Anreicherung.....	78
4.4.1 Defekte in der intrazelluläre Proteinsortierung verändern die Cs- und Sr-Anreicherung	78
4.4.1.1 Vps-Mutanten haben einen erhöhten Sr-Gehalt.....	79
4.4.1.2 Die Cs-Anreicherung wird durch Defekte in der Proteinsortierung vermindert.....	82
4.4.2 Die Funktion der V-ATPase ist essentiell für die Anreicherung von Cs	83
4.5 Verschiedene Transportproteine beeinflussen die Cs-Anreicherung.....	85
4.6 In einigen Transportermutanten ist die Sr-Anreicherung verändert.....	86
4.7 In der Analyse wurden bisher unbekannte Proteine identifiziert	89
4.7.1 Haben YGR125W und YDR089W eine Funktion in der Sr-Homöostase?	89
4.7.2 Welche Funktion erfüllt YDR090C in der Zelle?	90
5. Zusammenfassung.....	91
6. Summary	92
7. Literaturverzeichnis	93
8. Tabellenverzeichnis	102
9. Abbildungsverzeichnis	103
10. Anhang	104
11. Danksagung	106
12. Curriculum Vitae.....	107

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
Ca	Calcium
cpm	"count per minute"
Cs	Cäsium
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G418	Geneticin, Antibiotikum
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
LB	"Luria-Broth" (Medium für <i>E. coli</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, Puffersubstanz
Mg	Magnesium
min	Minute
OD	Optische Dichte
ORF	"open reading frame"
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteaseinhibitor
Rb	Rubidium
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SC	„Synthetic Complete“ (synthetisches Komplettmedium für <i>S. cerevisiae</i>)
SD	„Synthetic Dextrose“ (synthetisches Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec, s	Sekunde
SOC	„Super Optimal Broth“ (Medium für <i>E. coli</i>)
Sr	Strontium
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz
YPD	"Yeast Extract-Peptone-Dextrose" (Komplettmedium für <i>S. cerevisiae</i>)
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter (1 µl = 1x10 ⁻⁶ l)
Gy	Gray, Energiedosis (1 Gy = 1J/kg)
Bq; kBq	Becquerel; Kilo-Becquerel (1 Bq = 1 s ⁻¹)
keV	Kilo-Elektronenvolt (1 eV = 1,602x10 ⁻¹⁹ J)
ml	Milliliter (1 ml = 1x10 ⁻³ l)
mM	Millimolar (1 mM = 1x10 ⁻³ Molar oder 0,001 mol/l)
Sv	Sievert, Äquivalentdosis (1 Sv = 1J/kg)

1. Einleitung

1.1 Strahlung und Strahlenschutz

„Es darf keine Strahlenanwendung ohne einen daraus resultierenden Nutzen geben.“

(1. Grundsatz der Internationalen Kommission für Strahlenschutz)

Unter Strahlenschutz versteht man den Schutz des Menschen und der Umwelt vor der schädigenden Wirkung ionisierender und nicht ionisierender Strahlung aus natürlichen und künstlichen Strahlenquellen. Aus diesem Grund sind vom Gesetzgeber Richtlinien vorgegeben, die den Umgang mit radioaktiven Stoffen reglementieren bzw. als Grundlage für die Abschätzung von Risiken dienen. Zum besseren Verständnis wird in den folgenden Abschnitten näher auf ionisierende Strahlung eingegangen.

1.1.1 Ionisierende Strahlung – Quellen

Die Quellen für ionisierende Strahlung können in zwei Kategorien unterteilt werden. Einerseits existiert eine natürliche Hintergrundstrahlung, die sich aus der kosmischen und terrestrischen Strahlung (z.B. durch ^{40}K , ^{222}Rn oder ^{238}U) zusammensetzt. Weiterhin werden natürliche Radionuklide durch menschliche Aktivitäten (z.B. durch Kohleverbrennung oder Bergbau) zusätzlich in die Atmosphäre freigesetzt oder künstliche Isotope in kerntechnische Anlagen erzeugt. Der Mensch ist demnach ständig ionisierender Strahlung ausgesetzt – äußerlich durch seine Umwelt und innerlich durch inkorporierte Radionuklide (z.B. durch Nahrungsmittel). Zudem tragen viele medizinische Techniken maßgeblich zur Strahlenbelastung des Menschen bei (Röntgenaufnahme, Computertomographie, Nuklearmedizin). Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 1.1 gegeben. Eine Begrenzung der Strahlenexposition des Menschen kann durch die verminderte Aufnahme von Radionukliden über die Nahrung und durch eine Einschränkung der medizinischen Strahlenanwendung auf ein notwendiges Minimum erreicht werden.

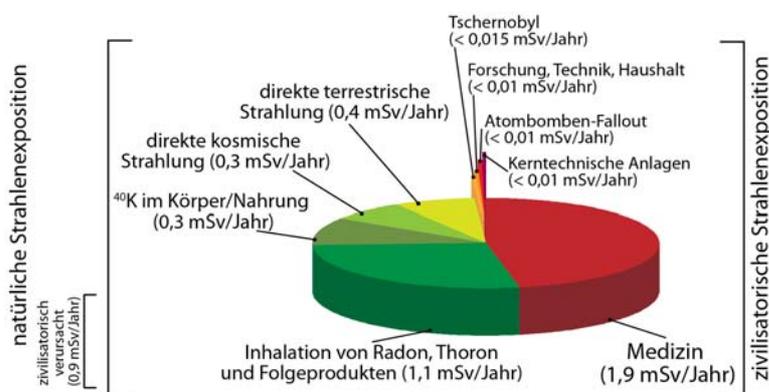


Abbildung 1.1

Strahlenbelastung der Bevölkerung in Deutschland

Die Strahlenbelastung der Bevölkerung in Deutschland setzt sich zusammen aus der natürlich (ca. 2,1 mSv/Jahr) und der zivilisatorischen, vom Menschen erzeugte Strahlung (ca. 2 mSv/Jahr). Den größten Anteil der Strahlenexposition stellen medizinische Anwendungen mit durchschnittlich 1,9 mSv effektiver Jahresdosis pro Bundesbürger dar (BMU 2007).

1.1.2 Ionisierende Strahlung – Arten

Direkt ionisierende Strahlung entsteht beim Zerfall instabiler Nuklide und es werden drei verschiedene Arten unterschieden: **Alpha- (α)** und **Beta-Strahlung (β)** sind so genannte Korpuskularstrahlungen (corpuskulum = Teilchen). Im Falle der α -Strahlung handelt sich um einen Strom aus zweifach positiv geladenen Heliumkernen, wohingegen β -Strahlung aus Elektronen (β^-) oder Positronen (β^+) besteht. **Gammastrahlung (γ)** entsteht als Folge eines vorangegangenen radioaktiven Zerfalls, bei dem α - oder β -Teilchen freigesetzt wurden. Das verbleibende Tochternuklid befindet sich in der Regel in einem angeregten Zustand. Beim Übergang in einen energetisch niedrigeren oder den Grundzustand wird diese Anregungsenergie in Form von hochfrequenter, elektromagnetischer Strahlung (> 200 keV)

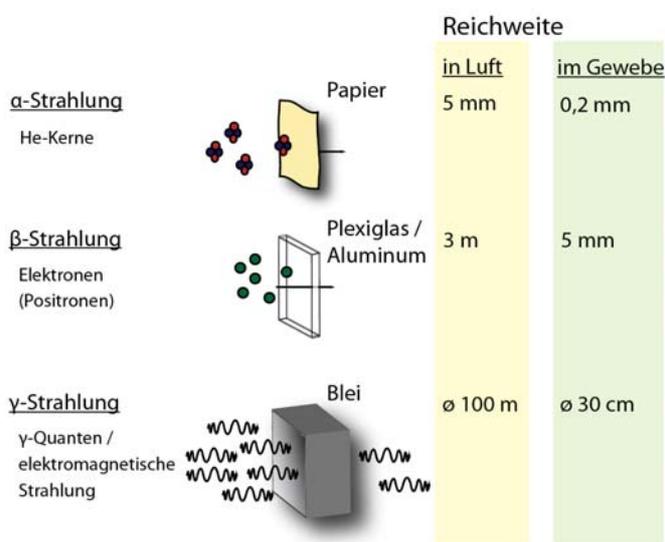


Abbildung 1.2

Vergleich α -, β - und γ -Strahlung

α -, β - und γ -Strahlung können in Teilchen- oder Energiestrahlung unterschieden werden. Weiterhin unterscheiden sie sich in ihrer Durchdringungskraft bzw. in ihrer Reichweite in Geweben (Abbildung nach (Krieger 2004, Grupen 2008)).

freigesetzt. Die abgegebene Strahlung kann somit nur bestimmten Energien entsprechen, nämlich der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen des Tochternuklids. Folglich ist γ -Strahlung durch ein diskretes Energiespektrum gekennzeichnet. Sie stellt die durchdringendste der drei vorgestellten Strahlungsarten dar, weist in der Regel jedoch niedrigere Energien auf als α - oder β -Strahlung.

Die Energieübertragung erfolgt durch Absorptions- und Stoßprozesse, die zur Anregung von Elektronen des Absorbers in höhere Energieniveaus führen. Dabei kann es zur Ionisation kommen, wenn die Anregungsenergie groß genug ist, um das Elektron aus seinem ursprünglichen Atomverband zu lösen (Krieger 2004).

1.1.3 Ionisierende Strahlung – Dosimetrie und Grenzwerte

Die Strahlenwirkung kann anhand der Energiedosis quantifiziert werden, die in Gray angegeben wird ($\text{Gy} = 1\text{J/kg}$). Die **biologische Strahlenwirkung** berücksichtigt zusätzlich die Qualität der Strahlung, denn wie in Abschnitt 1.1.2 bereits angedeutet, haben verschiedene Strahlenarten unterschiedliche Eigenschaften. Dazu werden Gewichtungsfaktoren (w_R) mit der gemessenen Dosis multipliziert, die die relative biologische Wirksamkeit der Strahlung widerspiegeln (Tabelle 1.1). Man spricht in diesem Fall von der so genannten Äquivalentdosis, angegeben in Sievert ($\text{Sv} = 1\text{J/kg}$). Im Alltag wird die Strahlenbelastung als **effektive Dosis** angegeben, die zusätzlich die Empfindlichkeit verschiedener Organe einbezieht (siehe Abbildung 1.3).

Art und Energiebereich	W_R
Gamma -Strahlung (Photonen, alle Energien)	1
Beta -Strahlung (Elektronen und Myonen, alle Energien)	1
Protonen (Energie > 2 MeV)	5
Neutronen (in Anhängigkeit von der Energie)	5-20
Alphastrahlung (Alphateilchen, Spaltfragmente, schwere Kerne)	20

Tabelle 1.1

Wichtungsfaktoren verschiedener Strahlungsarten

γ -Strahlung ist zwar durchdringender als α - oder β -Strahlung, weist aber in der Regel niedrigere Energien auf und erhält einen Wichtungsfaktor von 1. α -Strahlung besitzt nur kurze Reichweiten in Luft und Gewebe, zeichnet sich aber durch hohe Energien auf. Bei Ingestion von α -Strahlern besteht deshalb erhöhte Gesundheitsgefahr, der Wichtungsfaktor ist 20 (Strahlenschutzverordnung 2001).

Gesetzlich sind Grenzwerte festgelegt, die die Bevölkerung und beruflich strahlenexponierte Personen vor Risiken schützen sollen. So sollten effektive Dosen von 1 mSv für die Bevölkerung bzw. 20 mSv für beruflich exponierte Personen zusätzlich zu der natürlichen Strahlenbelastung pro Jahr (siehe Abb. 1.1) nicht überschritten werden (Strahlenschutzverordnung 2001, Krieger 2004).

1.1.4 Ionisierende Strahlung – Biologische Wirkung

Ionisierende Strahlung führt zur Anregung von Elektronen bzw. Atomen des Absorbers. Da Organismen zum Großteil aus Wasser bestehen, verursacht ionisierende Strahlung in erster Linie eine Radiolyse des Zellwassers, was zur Erzeugung einer Vielzahl von hochreaktiven Spezies wie zum Beispiel Hydroxyl- und Wassertoffradikalen ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$) führt. Diese können mit anderen Molekülen in der Zelle reagieren und weitere reaktive Verbindungen erzeugen und auf diese Weise erhebliche Schäden verursachen. Die ionisierende Strahlung kann auch direkt Makromoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, in der Zelle treffen, was zu Funktionsveränderungen oder -verlusten der betreffenden Moleküle führen kann.

Die Auswirkungen von Strahlung auf den Menschen werden in deterministische und stochastische Strahlenschäden unterschieden. Bei deterministischen Strahlenschäden besteht ein Zusammenhang zwischen applizierter Dosis und den entstandenen Schäden. Sie treten besonders bei sehr hohen Dosen auf, die auf einmal erhalten wurden und sind in erster Linie auf die Abtötung von Zellen zurückzuführen. Beim Menschen führt eine Ganzkörperbestrahlung von > 500 mSv zur so genannten Strahlenkrankheit. Im Falle von subletalen Dosen (unter ca. 4,5 Sv) kommt es meistens wieder zur Genesung, es treten jedoch häufig Spätfolgen wie Anämie, Schwächung des Immunsystems, Unfruchtbarkeit oder verschiedene Krebsarten auf.

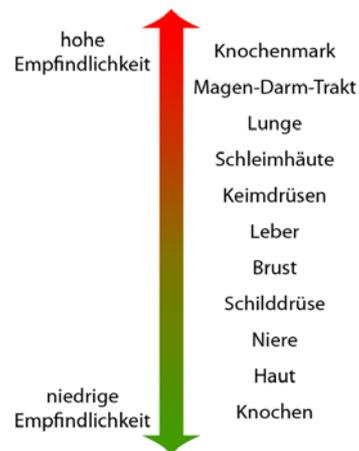


Abbildung 1.3

Strahlungsempfindlichkeit verschiedener Organe

Knochenmark, Magen-Darm-Trakt und Schleimhäute zeichnen sich durch eine hohe Strahlenempfindlichkeit aus. Relativ unempfindlich sind dagegen Schilddrüse und Haut (Abbildung nach (Volkmer 2007)).

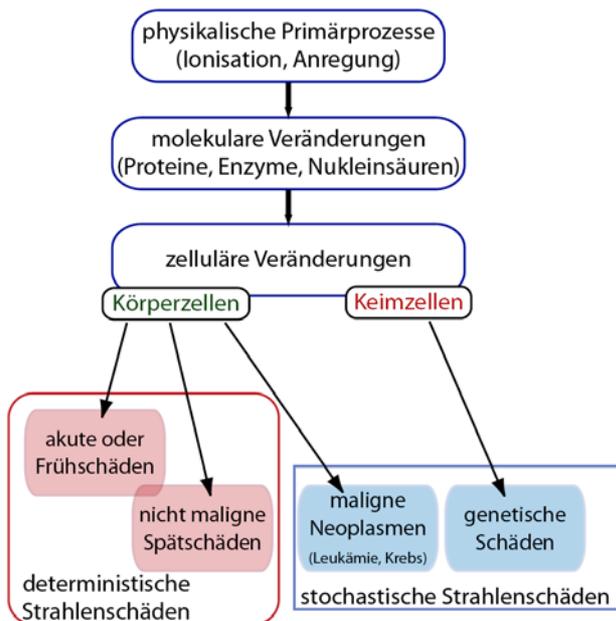


Abbildung 1.4

Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

Klassifizierung der Strahlenwirkung nach stochastischen und deterministischen Strahlenschäden (nach (Gruppen 2008)).

Stochastische Strahlenschäden sind dosisunabhängig, das heißt sie können auch in Folge einer sehr geringen Strahlenexposition auftreten. Sie führen zu zufälligen Mutationen des Erbguts. Betroffene Zellen sind in der Regel weiterhin lebensfähig, aber es kann zur Entartung und nach meist längeren Latenzzeiten zur Krebsentstehung kommen. Sind Keimzellen betroffen, so besteht die Gefahr, dass die Schädigung an die nächste Generation weitergegeben werden kann (siehe Abbildung 1.4).

Zusammenfassend sind deterministische Strahlenschäden durch eine Limitation der erhaltenen Strahlendosis vermeidbar, bei stochastischen Strahlenschäden hingegen wird dadurch lediglich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens reduziert (Mensch+Umwelt 2006).

1.2 Verbreitung von künstlichen Radionukliden in der Umwelt

Die Nutzung der Kerntechnik hat für den Menschen sowohl positive als auch negative Folgen. Auch die friedliche Verwendung radioaktiver Materialien birgt die Gefahr, dass es zu Kontaminationen, also einer unbeabsichtigter Freisetzung und Verbreitung kommen kann. In den folgenden Abschnitten wird am Beispiel von Tschernobyl verdeutlicht, wie und welche künstlichen Radionuklide zur Kontamination unserer Umwelt beitragen und wie diese in biologische Kreisläufe und folglich in unsere Nahrungsmittel gelangen.

1.2.1 Der Reaktorunfall von Tschernobyl und seine Folgen

Infolge des Reaktorunfalls von Tschernobyl wurden Schätzungen zufolge bis zu 8×10^{18} Bq radioaktives Material in Form von Partikeln oder Gasen freigesetzt. Im näheren Umkreis des Reaktors kam es zur Ablagerung von Kernbrennstoffteilen und größeren, radioaktiven Aerosolen, wohingegen kleinere Aerosolpartikel und Gase weiträumig über ganz Europa verteilt wurden. In den ersten Wochen nach dem Unfall stellte radioaktives Iod (^{131}I , $t_{1/2} = 8$ d) die größte Quelle der Strahlenbelastung durch die Inhalation kontaminierter Luft und die Aufnahme von belasteten Nahrungsmitteln (Milch, Gemüse) dar. Nach dem Abklingen von ^{131}I wurde bzw. wird die Strahlenbelastung der Bewohner von den kontaminierten Gebieten vor allem durch langlebige Nuklide hervorgerufen. Zu diesen Radionukliden zählen die Cäsium-Isotope ^{134}Cs ($t_{1/2} = 2,06$ a) und ^{137}Cs ($t_{1/2} = 30$ a) sowie im näheren Umfeld von Tschernobyl auch das Strontium-Isotop ^{90}Sr ($t_{1/2} = 29,0$ a). Die

Deposition dieser Radionuklide mit Aerosolpartikel auf Boden und Oberflächenwasser trägt zur externen Strahlenexposition bei, aber auch zu internen Exposition als Folge der Kontamination von Nahrungsmitteln bei (vor allem Feldfrüchte, Milch und Fisch) (UNSCEAR 2000).

Durch das Reaktorunglück wurden ausgedehnte Gebiete in Weißrussland, Russland und der Ukraine kontaminiert, in denen ca. 5 Millionen Menschen leben. Eine Gesamtfläche von 150.000 km² wiesen Aktivitäten von mehr als 37 kBq ¹³⁷Cs/m² auf, was als Grenzwert für kontaminierte Böden festgelegt wurde. In vielen Landstrichen werden noch heute weitaus höhere Belastungen von über 200 kBq ¹³⁷Cs/m² gemessen und die maximale Kontamination innerhalb der 30 km-Zone rund um Tschernobyl liegt bei 55.000 kBq ¹³⁷Cs/m². Aber auch in weiter entfernten Regionen kam es zu starken Kontaminationen als Folge des Reaktorunglücks; so befinden sich in Schweden und Finnland Gebiete von insgesamt 23.000 km², die mit durchschnittlich 37-185 kBq ¹³⁷Cs/m² belastet sind. Diese weitläufige Kontamination der Böden und Gewässer führte zum einen zur Strahlenbelastung von Umwelt und Menschen und andererseits zu dramatischen, wirtschaftlichen Ausfällen in den betroffenen Regionen, da ausgedehnte landwirtschaftliche Nutzflächen stillgelegt werden mussten. Auch regionale Lebensmittel wie Wild, Fisch und Pilze weisen noch heute hohe ¹³⁷Cs-Belastungen auf, die auf diesem relativ konstant hohen Niveau verbleiben (UNSCEAR 1988, UNSCEAR 2000). Zusammenfassend stellen die langlebigen Radionuklide ¹³⁷Cs und ⁹⁰Sr auch nach mehr als 20 Jahren noch eine Belastung für den Menschen dar. Die Auswirkungen einer solchen Langzeitexposition gegenüber moderat hohen Strahlendosen sind nach heutigem Stand der Wissenschaft jedoch nicht genau voraussagbar.

1.2.2 Der Eintrag von Radiocäsium und -strontium in biologische Systeme

Die radioaktiven Isotope ¹³⁷Cs oder ⁹⁰Sr werden gasförmig bzw. in Form von Aerosolen in die Atmosphäre entlassen oder sie sind im Kühlwasser kerntechnischer Anlagen enthalten und gelangen direkt in aquatische Systeme. Durch Depositionsprozesse gelangen die gasförmig freigesetzten Elemente in Gewässer und Böden, wo sie von verschiedenen Organismen aufgenommen werden, wenn sie in einer biologisch verfügbaren Form vorliegen (Avery 1996). Auf die biologische Verfügbarkeit von Cäsium (Cs) und Strontium (Sr) wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Sind die Radioisotope in Gewässern gelöst, so werden sie von Mikroorganismen, Wasserpflanzen und Tieren angereichert. Dieser Effekt ist in Süßwassersystemen weitaus größer als in den Meeren (Fleishman et al. 1994, Avery 1996). In den umliegenden Gewässern des Tschernobyl-Reaktors konnte beispielsweise in Fischen eine Anreicherung von ¹³⁷Cs um den Faktor 120 und für ⁹⁰Sr um den Faktor 8 gegenüber dem (kontaminierten) Wasser ermittelt werden (Sazykina 2000).

Bei der Ablagerung radioaktiver Partikel kann zwischen trockener und nasser Deposition unterschieden werden. Trockene Deposition beschreibt den Übergang von Gasen und Aerosolpartikeln aus der Luft auf den Boden oder die Vegetation. Unter nasser Deposition versteht man die Ablagerung radioaktiven Materials mit Niederschlägen. Auf diese Weise werden höhere Konzentrationen an Radionuklide in den Boden hinein transportiert und/oder direkt von Pflanzen zurückgehalten.

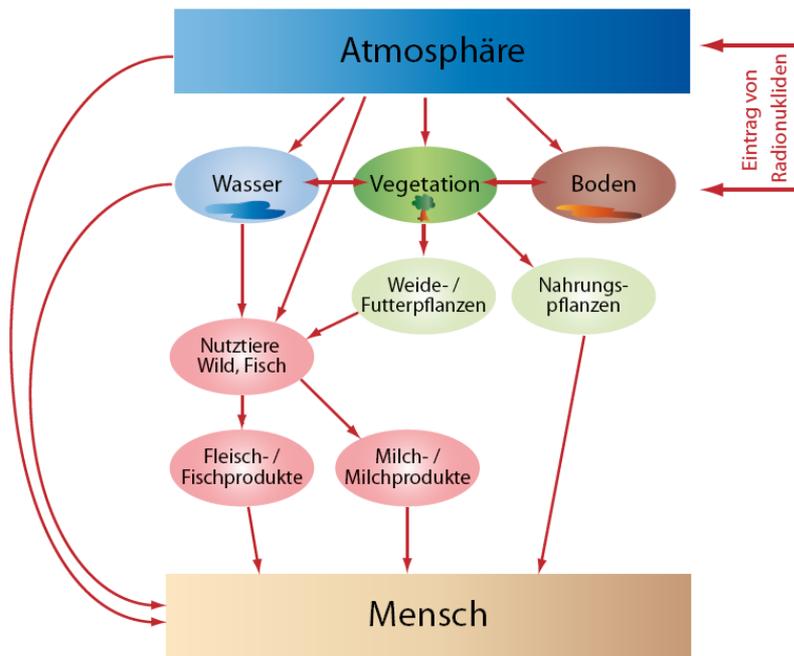


Abbildung 1.5
Verbreitung von Radionukliden in der Umwelt

Die Verbreitung von Radionukliden findet in Form von Gasen, Aerosolen und gelöst in Wasser statt. Durch den Eintritt in den biologischen Kreislauf werden sie auch Teil unserer Nahrung (über Pflanzen/Tiere) (nach (Gruppen 2008)).

Die Anreicherung von Radionukliden in Pflanzen ist der entscheidende Schritt beim Übertritt der Radionuklide in die menschliche Nahrung. Die Aufnahme und Anreicherung von Radionukliden durch Pflanzen kann über zwei Wege stattfinden: die Absorption der Radionuklide über die Blätter oder die aktive Aufnahme über die Wurzel. Direkt nach der Freisetzung von Radioaktivität durch Unfälle oder Atomwaffentests stellt vor allem die Absorption der Radionuklide über die Blätter den größten Beitrag zur Strahlenexposition durch die Nahrung dar. Dabei entscheidet die Beschaffenheit der Blätter maßgeblich über den Umfang der Aufnahme. Eine dünne Kutikula und Blätter mit stark vergrößerter Oberfläche nehmen dabei mehr Radionuklide auf (Koranda & Robison 1978). Experimente mit Weinreben zeigten, dass 50 % einer aufgesprühten Aktivität von ^{134}Cs und ^{85}Sr von den Blättern aufgenommen und in die Pflanze verteilt werden (Carini & Lombi 1997). Durch die Oberflächenkontamination von Feldfrüchten gelangten auch ^{137}Cs und ^{90}Sr nach dem Reaktorunglück von Tschernobyl sehr schnell in die Nahrung des Menschen, da sie gut von Blättern absorbiert werden. Dabei spielen sowohl passive als auch aktive Mechanismen bei der Aufnahme in die Pflanze eine Rolle, wobei aktive Transportprozesse an den Glucosemetabolismus gekoppelt sind (Avery & Tobin 1992). Cs wird dabei effizienter von Blättern absorbiert als Sr (Carini & Lombi 1997). Eine Verteilung des Sr vom Blatt in die restliche Pflanze erfolgt nur in geringem Umfang, hier sind vor allem die Blätter Hauptspeicherort der Radioaktivität. Cs hingegen wird effizient in der Pflanze verteilt und gelangt auch in Früchte und Samen (Middleton 1959, Bukovac et al. 1965, Carini & Lombi 1997). Längerfristig ist jedoch die Aufnahme der Radionuklide durch die Wurzel von größerer Bedeutung. Oberflächlicher, radioaktiver „Fallout“ wird rasch in den Boden eingetragen und somit stehen ^{137}Cs und ^{90}Sr gelöst im Bodenwasser oder bereitgestellt durch Mikroorganismen für die Wurzelaufnahme der Pflanzen zur Verfügung (Schimmack & Bunzl 1996, Carini & Lombi 1997, Absalom et al. 2001, Prohl et al. 2006). Über die Pflanzen gelangen die Radionuklide direkt in die menschliche Nahrung oder sie dienen Nutztieren als Nahrungsquelle. In Tieren kommt es ebenfalls zur Anreicherung der Radionuklide in bestimmten Organen und Geweben (siehe Anreicherung im Menschen in 1.3.2. und

1.3.5). Durch diese mehrfach stattfindende Radionuklid-Anreicherung i) in Pflanzen und ii) in Tieren steigt ebenfalls die Strahlenexposition des Menschen durch seine Nahrungsmittel (Abbildung 1.5).

1.3 Cäsium und Strontium

Radiocäsium und Radiostrontium tragen einen erheblichen Anteil zur Strahlenexposition des Menschen durch seine Nahrung bei. Problematisch ist vor allem die extrem hohe biologische Verfügbarkeit von Cs und Sr, die in der chemischen und physikalischen Ähnlichkeit zu essentiellen Elementen wie Kalium (K) bzw. Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) begründet ist.

1.3.1 Cäsium – Eigenschaften

Cäsium (Symbol: Cs) ist ein Vertreter der Alkalimetalle mit einem Molekulargewicht von 132.9 g/mol und der Ordnungszahl 55. Cs ist das reaktionsfreudigste der Alkalimetalle und eine sehr starke Base (Reduktionsmittel). In Lösung kommt es als monovalentes Kation (Cs^+) vor (Avery 1995). Cs ist kein essentielles Element für Organismen und zeigt ab einer bestimmten Konzentration toxische Wirkungen. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zwischen Cs und den anderen Alkalimetallen, allen voran Kalium (K), weisen Cs-Ionen aber eine hohe Mobilität und Bioverfügbarkeit auf (Komarov & Bennett 1983, Avery et al. 1992). K^+ , Rb^+ , NH_4^+ und Cs^+ haben im hydratisierten Zustand fast identische Dimensionen und auch die nicht hydratisierten Ionen zeigen geringe Unterschiede, so dass wenig selektive Aufnahmemechanismen von Mikroorganismen und Pflanzen nicht oder nur geringfügig zwischen den verschiedenen Ionen unterscheiden können (siehe Tabelle 1.2).

Element	Ionenradius	Hydratationsradius
Li^+	94 pm	382 pm
Na^+	117 pm	358 pm
K^+	149 pm	331 pm
Rb^+	163 pm	329 pm
Cs^+	186 pm	329 pm
NH_4^+	148 pm	331 pm

Tabelle 1.2
Ionenradien monovalenter Kationen

Die Dimensionen der hydratisierten Ionen von K, Rb, Cs und NH_4^+ sind fast identisch, lediglich Na^+ und Li^+ weisen eine deutlich größere Hydrathülle auf (Volkov et al. 1997).

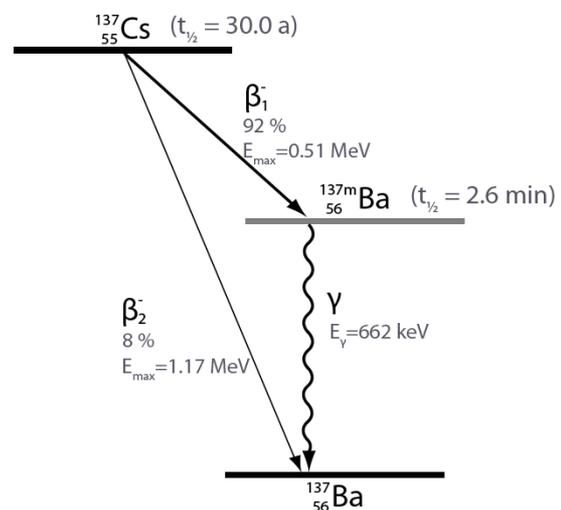


Abbildung 1.6
Zerfallschema für ^{137}Cs

^{137}Cs mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Jahren zerfällt zum stabilen Ba unter Aussendung von β^- - bzw. β^- - und γ -Strahlung (übernommen aus (Gruppen 2008)).

Neben dem natürlich vorkommenden, stabilen Isotop ^{133}Cs gibt es zahlreiche künstlich erzeugte, radioaktive Isotope. ^{134}Cs und ^{137}Cs zählen zu den am häufigsten auftretenden Radioisotopen und weisen sehr lange Halbwertszeiten von 2,06 bzw. ca. 30 Jahren auf. Beide Radionuklide sind

Nebenprodukte von Kernreaktionen. Der Zerfall von ^{137}Cs zu seinen Folgeprodukten ist exemplarisch in Abbildung 1.6 dargestellt. Sowohl ^{137}Cs als auch ^{134}Cs emittieren β - und γ -Strahlung.

1.3.2 Cäsium – Vorkommen

Cs gehört zu den ständigen Begleitern von Kalium und Natrium. Der größte Teil dieses Alkalimetalls ist in der Erdkruste gebunden. Es findet sich in Mineralquellen, Salzlagern, Gesteinen, aber auch zu einem geringen Anteil gelöst in den Ozeanen. Insgesamt besteht 6×10^{-4} % der Erdhülle (Erdkruste+Gewässer) aus Cs. Des Weiteren sind Spuren von Cs in nahezu allen lebenden Organismen zu finden (Ghosh et al. 1993, Avery 1995). Die Konzentration von ^{133}Cs variiert beträchtlich in Abhängigkeit der lokalen Begebenheiten. Böden und Sedimente enthalten zwischen 0,3 und 25 mg Cs/kg und in aquatischen Ökosystemen können 0,01 – 1,2 $\mu\text{g/L}$ gemessen werden (Komarov & Bennett 1983, Avery 1995).

Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts kam es durch die Nutzung der Kerntechnik zu ausgedehnten Kontaminationen mit radioaktiven Cs-Isotopen (hauptsächlich ^{137}Cs). Aufgrund der langen Halbwertszeit und guten Wasserlöslichkeit weist ^{137}Cs noch viele Jahre nach der Freisetzung eine hohe Bioverfügbarkeit auf. Gleichzeitig findet keine Diskriminierung zwischen verschiedenen Isotopen eines Elementes statt, so dass auch das radioaktive ^{137}Cs von Organismen aufgenommen wird. In kontaminierten Gewässern erfolgt eine Anreicherung von radioaktiven Cs vor allem in Algen und marinen Lebewesen (Sazykina 2000, Andersen et al. 2006). An Land zeigt ^{137}Cs eine starke Bindung an Böden und Sedimente, aus denen es von Mikroorganismen oder Pflanzen aufgenommen werden kann und in die Nahrungskette gelangt (Komarov & Bennett 1983, Schimmack & Bunzl 1996, Szerbin et al. 1999).

Die biologische Verfügbarkeit von Cs bzw. ^{137}Cs im Boden hängt von einer Vielzahl physikalischer und chemischer Faktoren ab. Vor allem Tonminerale und Humus binden Cs mit hoher Affinität, wobei mineralische Komplexe gebildet werden (Szerbin et al. 1999, Absalom et al. 2001, Waegeneers et al. 2005). Auch das pH-Milieu ist entscheidend: Bei schwach saurem bis alkalischem pH ist Cs nahezu immobilisiert, wohingegen in sauren Böden wenig Cs komplexiert ist und somit vermehrt für eine Aufnahme zur Verfügung steht (Valcke & Cremers 1994). Allgemein ist die Mobilität von Cs im Boden sehr gering. Noch 10 Jahre nach dem Unfall von Tschernobyl wurde das eingetragene ^{137}Cs fast ausschließlich in den obersten Bodenschichten (bis 7 cm) gefunden (Schimmack & Bunzl 1996). Somit ist es langfristig für Pflanzen und Mikroorganismen in relativ konstant hoher Aktivität verfügbar. Die Aufnahme von Cs durch den Menschen erfolgt in erster Linie über Trinkwasser und Nahrungsmittel wie Feldfrüchte, Fleisch und Milch, wobei das aufgenommene Cs fast vollständig vom Magen-Darm-Trakt resorbiert wird. Die biologische Halbwertszeit, also die Zeit, nach der die Hälfte des aufgenommenen Cs wieder ausgeschieden wird, beträgt ca. 110 Tage. Eine Anreicherung findet in Muskeln und Weichgeweben statt (Volkmer 2007).

1.3.3 Cäsium – Aufnahme in Pflanzen

Pflanzen stellen einen zentralen Punkt beim Übertritt von radioaktivem Cs in die Nahrung dar. Die Aufnahme von Cs durch Pflanzen ist seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts Gegenstand der

Forschung. In jener Zeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Cs von Pflanzen angereichert wird. Zwischen verschiedenen Pflanzen-Spezies konnte in diesem Zusammenhang ein bis zu 20-facher Unterschied in der Cs-Akkumulation festgestellt werden (Zhu & Smolders 2000). Dabei erfolgt die Aufnahme von Cs und dem essentiellen K bei gleichen Konzentrationen ungefähr gleich schnell (Collander 1941). Bei gleichzeitiger Präsenz von K und Cs im Boden sind Pflanzen in der Lage, in einem bestimmten Umfang gegenüber Cs zu diskriminieren (Zhu & Smolders 2000, Hampton et al. 2005). Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass Cs über die gleichen Transportwege wie K in die Pflanzenwurzel aufgenommen wird (Epstein & Hagen 1952, White & Broadley 2000, Zhu & Smolders 2000, Hampton et al. 2005, Qi et al. 2008). Die Aufnahme erfolgt symplastisch, das heißt die Ionen werden über die Plasmamembran kortikaler Zellen aufgenommen und durch das Cytoplasma der durch Plasmodesmata verbundenen Wurzelzellen weitertransportiert (Hampton et al. 2004).

Anhand von Aufnahmekinetiken wurde außerdem festgestellt, dass mehrere Mechanismen zur Aufnahme von K und Cs beitragen (Epstein 1972, Shaw & Bell 1989, White & Broadley 2000, Hampton et al. 2005). An verschiedenen Modellpflanzen wie Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Gerste (*Hordeum vulgare*) oder Weizen (*Triticum aestivum*) konnten in den vergangenen Jahrzehnten große Fortschritte bei der molekularen Charakterisierung dieser Transportwege gemacht werden – so kam es zur Entdeckung verschiedener K-Transporterklassen: KUP/HAK-Transporter („*K⁺ uptake permease*“ / „*high affinity K⁺ transporter*“) welche den hochaffinen K-Transport vermitteln. Daneben wurde eine Vielzahl von K-Kanälen vom Typ KIRC („*K⁺ inward rectifying channel*“), VICC („*voltage insensitiv cation channel*“) oder KORC („*K⁺ outward rectifying channel*“) identifiziert (Referenzen für alle Transportertypen in (White & Broadley 2000)). Verschiedene Experimente und Modellierungen implizieren, dass die Aufnahme von Cs unter physiologischen Bedingungen vor allem durch VIC-Kanäle und zu einem geringeren Anteil durch KUP/HAK-Transporter in die Pflanzenwurzel erfolgt (White & Lemtiri-Chlieh 1995, Haro et al. 1999, White 1999, White & Broadley 2000, Hampton et al. 2005, Qi et al. 2008). Unter K-defizienten Bedingungen wird die Cs-Aufnahme vorwiegend von KUP/HAK-Transportern vermittelt (Hampton 2005). Dies wurde erst kürzlich am Beispiel von AtHAK5, einem KUP/HAK-Transporter, in *A. thaliana* demonstriert (Qi et al. 2008).

Die Komplexität der Cs-Aufnahme in der Pflanze erschwert die Charakterisierung einzelner Transportproteine, die vielleicht Wege eröffnen würden, die Anreicherung des toxischen Kations auf molekularer Ebene zu beeinflussen. Gleichzeitig ist es möglich, dass bisher noch nicht beschriebene Proteine an der Cs-Aufnahme teilhaben. So bietet es sich an, erste Schritte bei der näheren Charakterisierung der Aufnahmemechanismen an einzelligen Organismen zu erarbeiten, wie es zum Beispiel am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* möglich ist. Die Wechselwirkung von Cs mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist teilweise untersucht und die bekannten Fakten werden in Abschnitt 1.4.1 näher beschrieben.

1.3.4 Strontium – Eigenschaften

Strontium (Sr) ist ein Erdalkalimetall, mit der Ordnungszahl 38 und einer molekularen Masse von 87,62 g/mol. Wie alle Erdalkalimetalle ist es in elementarer Form sehr reaktionsfreudig und oxidiert an Luft schnell. In Lösung liegt Sr als zweifach positiv geladenes Kation (Sr^{2+}) vor.

Natürlich kommen vier stabile Sr-Isotope auf der Erde vor: ^{88}Sr (82,6 %), ^{87}Sr (7 %), ^{86}Sr (9,9 %) und ^{84}Sr (0,5 %). Daneben gibt es mehrere künstliche Radionuklide,

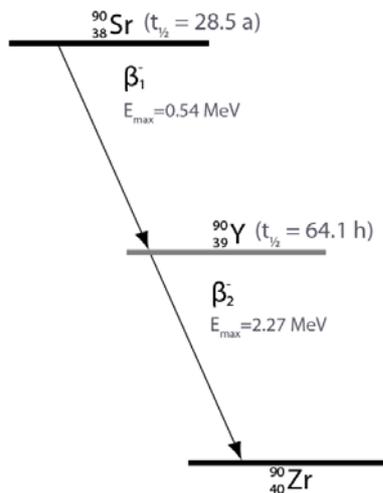


Abbildung 1.7

Zerfallschema für ^{90}Sr

^{90}Sr ist ein reiner β -Strahler, der zum stabilen umgewandelt wird (übernommen aus (Gruppen 2008)).

von denen ^{90}Sr aufgrund seiner langen Halbwertszeit von ca. 29 Jahren von besonderer Bedeutung ist. ^{90}Sr ist ein Nebenprodukt der Kernspaltung. Es zerfällt selbst zu Yttrium (^{90}Y), welches wiederum in das stabile Zirkonium (^{90}Zr) umgewandelt wird. Beide Zerfallsprozesse führen zur Freisetzung von Beta-Strahlung (siehe Abb. 1.7).

Sr weist eine ausgeprägte chemische und physikalische Ähnlichkeit zu den essentiellen Elementen Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) auf. Aufgrund dieser Eigenschaften und der guten Wasserlöslichkeit ist Sr in hohem Maße biologisch verfügbar. Genau wie bei Cs ist auch für Sr keine biologische bzw. zelluläre Funktion bekannt, obwohl es in der Lage ist, Ca in vielen zellulären Prozessen zu substituieren (Linas et al. 2006).

1.3.5 Strontium – Vorkommen

Sr ist mit einem Anteil von 0,01 % zwar stärker in der Erdhülle vertreten als Cs, es gehört aber zusammen mit Beryllium zu den seltenen Erdalkalimetallen. In der Natur kommt es nur gebunden vor, in erster Linie als Sulfat (Coelestin, SrSO_4) oder Carbonat (Strontianit, SrCO_3), aber auch gelöst im Boden. Im Boden findet die Adsorption von Sr an verschiedene Komponenten (z.B. Tonmineralien) statt, die jedoch nicht so spezifisch ist wie für Cs (Hakem et al. 2000). Ausschlaggebend für die Zurückhaltung von Sr (bzw. ^{90}Sr) ist die Kationen-Austausch-Kapazität des Bodens. Böden mit hoher Kapazität weisen eine geringe Sr-Mobilität auf (Prohl et al. 2006). Das Zusammenspiel zwischen Spezifität der Sr-Adsorption und der Kationen-Austausch-Kapazität des Bodens bestimmen maßgeblich, wie viel Sr für eine Aufnahme durch Pflanzen und Mikroorganismen zur Verfügung steht (Yamaguchi et al. 2007). Generell wird Sr aus dem Boden jedoch weit besser von Pflanzen aufgenommen als Cs (Carini & Lombi 1997).

Im Allgemeinen nehmen alle Organismen Sr auf, wobei ein größeres Angebot auch zu einer verstärkten Aufnahme führt. Der Mensch nimmt Sr vor allem durch sein Trinkwasser und Nahrungsmittel auf, vorwiegend über Getreide, Blattgemüse und Milch. Dabei werden ca. 20 % der aufgenommenen Menge vom Magen-Darm-Trakt resorbiert und gelangt in den Blutkreislauf. In Analogie zu Ca erfährt auch Sr eine Anreicherung in den Knochen, wo es mit einer biologischen

Halbwertszeit von ca. 50 Jahren verbleibt (Volkmer 2007). Die gesundheitlichen Risiken durch die Akkumulation von radioaktiven ^{90}Sr bestehen in dieser extrem langen biologischen Halbwertszeit und dem Anreicherungsort (Knochen) im menschlichen Körper, da vor allem das Knochenmark ein extrem strahlenempfindliches Gewebe darstellt (siehe Abbildung 1.3).

1.3.6 Strontium – Aufnahme in Pflanzen

Pflanzen absorbieren Sr entweder über die Blätter oder nehmen es aktiv über das Wurzelsystem auf (Koranda & Robison 1978). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu Ca wird angenommen, dass Sr über die gleichen Wege in die Pflanzenwurzel gelangt. Ein Beleg für diese Theorie ist die kompetitive Inhibition der Sr-Aufnahme durch Ca (Tamponnet et al. 2008).

Die Aufnahme von Ca in die Wurzel erfolgt im Gegensatz zu K (und Cs) hauptsächlich apoplastisch, also über Zellzwischenräume bis zum Casparischen Streifen. Erst dort wird Ca in die Zellen aufgenommen und durch symplastischen Transport weitergeleitet (Ehlken & Kirchner 2002). In Wurzelzellen konnten verschiedene Typen von Ca-permeablen Kanälen durch biochemische und elektrophysiologische Experimente identifiziert werden: i) spannungsabhängige Ca-permeable Kanäle (*VDCC2*), ii) *Maxi*-Kationenkanäle und iii) Hyperpolarisations-aktivierte Kanäle (*HACC*) (White et al. 2002). Zudem ist auch ein Ca-Transport über die bereits erwähnten spannungsunabhängigen Kationen-Kanäle (*VICC*, siehe 1.3.3) möglich. Obwohl eine Funktion bei der Nährstoffaufnahme vorstellbar ist, scheint die prinzipielle Aufgabe dieser Kanäle in der zellulären Signaltransduktion zu liegen. Inwieweit die Aufnahme von Sr den gleichen Mechanismen folgt wie Ca, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass *VDCC2* und *Maxi*-Kationenkanäle permeabel für nicht essentielle, divalente Kationen wie Sr^{2+} und Ba^{2+} sind (White 1998).

Auch für die Untersuchung der Sr-Aufnahme und -Anreicherung auf molekularer Ebene ist ein weniger komplexes Modellsystem (z.B. Hefe) zur Identifizierung einzelner Proteine besser geeignet.

1.4 Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Eukaryot mit einem relativ kleinen Genom, das 12,5 Megabasen bzw. 6200 Gene umfasst (Goffeau et al. 1996). Es bietet als Modellorganismus viele Vorteile bei genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen, da die Hefe über eine sehr hohe Wachstums- bzw. Reproduktionsrate verfügt und auf genetischer Ebene leicht zu manipulieren ist. Gleichzeitig weist *S. cerevisiae* ähnliche intrazelluläre Strukturen wie „höhere“ eukaryotischen Organismen (Tiere und Pflanzen) auf. Auch auf genetischer Ebene weist *S. cerevisiae* einen hohen Grad an Homologie zu Genen von Tieren und Pflanzen auf, wodurch grundlegende zelluläre Funktionen und Prozesse von der Hefe auch auf andere Systeme übertragbar sind. In Abbildung 1.8 sind eine Hefe- und eine Pflanzenzelle gegenüber gestellt, um zelluläre Ähnlichkeiten zu verdeutlichen.

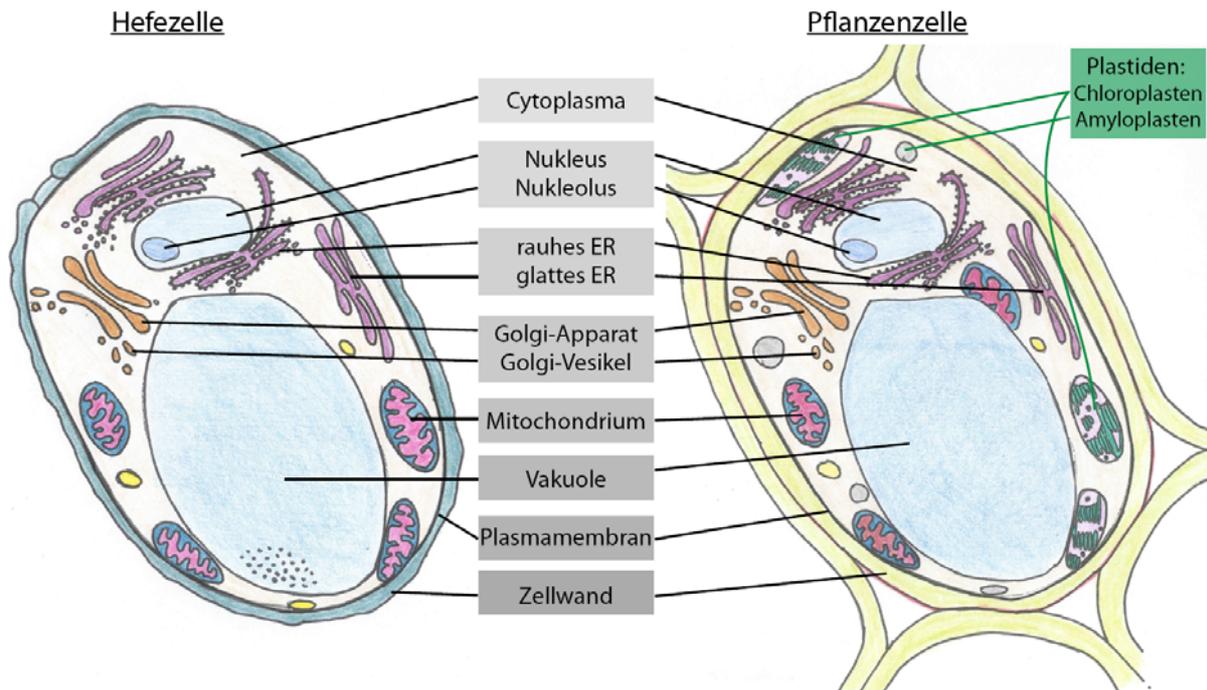


Abbildung 1.8

Vergleich von Hefe- und Pflanzenzelle

Beide Zelltypen verfügen über viele Gemeinsamkeiten, allen voran die Existenz einer Zellwand und Vakuole (die in tierischen Zellen nicht vorkommen). Die Unterschiede zwischen Hefe- und Pflanzenzellen bestehen in der Anwesenheit von Plastiden in der Pflanzenzelle, die diese zur Photosynthese befähigt bzw. als „Speicherorgane“ dienen. Weiterhin kommen pflanzliche Zelle in einem Gewebeverband vor, was für den Einzeller Hefe nicht zutrifft (Darstellung in Anlehnung an (Alberts 2003)).

Ein weiterer Vorteil in der Verwendung der Bäckerhefe ist, dass *S. cerevisiae* der bisher einzige Organismus ist, für den systematisch alle Gene sequenziert und deletiert wurden. So stehen Kollektionen von Mutantenstämmen zur Verfügung, die für reverse genetische Analysen verwendet werden können. Auf diese Weise kann von einer Mutante anhand ihres Phänotyps auf die Funktion des deletierten Gens zurückgeschlossen werden. Eine solche revers-genetische Analyse könnte auch neue Erkenntnisse über die Aufnahme und Anreicherung von Cs und Sr liefern. In den folgenden beiden Abschnitten werden die Aufnahmemechanismen für die essentiellen Elemente K und Ca in die Hefezelle genauer beschrieben, da über diese Wege potentiell auch Cs und Sr aufgenommen werden.

1.4.1 Kalium-Transport in *Saccharomyces cerevisiae*

K stellt in allen Organismen ein essentielles Element dar, das eine tragende Rolle in der zellulären Ionenhomöostase spielt (Rodriguez-Navarro 2000). Es dient in erster Linie dem Ausgleich negativer Ladungen von DNA, Proteinen und organischen Säuren. Eine weitere Funktion besteht in der Aktivierung verschiedener Enzyme (Suelter 1970, Rhodes et al. 1986) sowie in der Strukturgebung und Stabilisierung der Ribosomen (Hughes & Poole 1989). Außerdem spielt K eine wichtige Rolle bei der Formgebung und -erhaltung der Zelle, speziell bei zellwandfreien Zellen, da über den Turgordruck eine Stützfunktion vermittelt wird. Die K-Aufnahme und -Abgabe ist dabei ein entscheidendes Instrument zur Einstellung des Turgordrucks (Leigh & Jones 1984).

Der K-Gehalt in Zellen beträgt zwischen 50 und 250 mM, wohingegen in der Umgebung (Medium, Böden etc.) Konzentrationen von niedrigen μM bis zu wenigen mM auftreten können (Rodríguez-Navarro 2000). Das heißt, die Aufnahme von K in die Zellen erfolgt in der Regel gegen einen steilen Konzentrationsgradienten. Es gibt drei mögliche Transportformen, die zur Aufnahme von K beitragen – Transporter, Kanäle oder Pumpe (Rodríguez-Navarro 2000).

1.4.1.1 Kalium-Aufnahme

Im Jahre 1946 wurde erstmals beschrieben, dass die Aufnahme von K in Hefezellen im Austausch gegen Protonen erfolgt (Conway & O'Malley 1946). Knapp 30 Jahre später wurde in *Neurospora crassa* die Aktivität einer H^+ -ATPase in der Plasmamembran entdeckt, die die freierwerdende Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzt um Protonen aktiv in das Medium abzugeben (Slayman et al. 1973). Dadurch wird ein elektrochemischer Gradient an der Plasmamembran generiert, der für weitere Transportprozesse genutzt werden kann, beispielsweise um K gegen einen Gradienten in die Zelle zu befördern. Die Aufnahme von K erfolgt in *S. cerevisiae* hauptsächlich durch zwei Transporter, welche ähnliche Affinitäten für K aufweisen – Trk1p und Trk2p (Rodríguez-Navarro & Ramos 1984, Ramos & Rodríguez-Navarro 1986, Ramos et al. 1994, Madrid et al. 1998). Trk1p weist nur eine geringe Affinität für andere monovalente Kationen auf (Affinität: $\text{K} > \text{Rb} > \text{Cs} > \text{Na} > \text{Li}$, (Avery 1995)). Über den genauen Aufnahmemechanismus (Symport oder Uniport) besteht jedoch keine vollständige Klarheit. Trk1p verfügt über zwei Bindestellen für K (Borst-Pauwels 1981) – eine Aktivierungs- und eine Transportbindestelle. Bei sauren Bedingungen ($\sim\text{pH } 3$) wird ein K^+/H^+ -Symport postuliert, wohingegen bei höheren pH-Werten ($\sim\text{pH } 7$) ein K^+/K^+ -Symport (oder K^+ -Uniport) vorgeschlagen wird (Armstrong & Rothstein 1964, Borst-Pauwels 1981, Rodríguez-Navarro 2000). Für Trk2p werden ähnliche Eigenschaften postuliert, es wird jedoch angenommen, dass der Transporter im Normalfall hauptsächlich Protonen transportiert (Bihler et al. 1999).

Neben diesen beiden Transportern sind in der Hefe weitere Proteine an der Aufnahme von K beteiligt, die jedoch eine geringere Affinität für K besitzen und zudem eine sehr geringe Selektivität für K gegenüber anderen monovalenten Kationen aufweisen. In elektrophysiologischen Experimenten wurde ein nichtselektiver Kanal in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* beschrieben (NSC1, **N**on-**S**elective (cation/anion) **C**hannel 1), dessen molekulare Identität bisher nicht aufgeklärt werden konnte (Bihler et al. 1999). Dieser Kanal wird durch Ca oder andere divalente Kationen bei externen Konzentrationen über 0,1 mM blockiert (Bihler et al. 1998, Roberts et al. 1999). Andere Arbeiten argumentieren jedoch, dass es sich bei NSC1 um die kumulierte, niederaffine Aufnahme mehrerer, nichtverwandter Transporter handelt, die zum Beispiel gleichzeitig die Aufnahme von Zucker oder Aminosäuren vermitteln (Madrid et al. 1998).

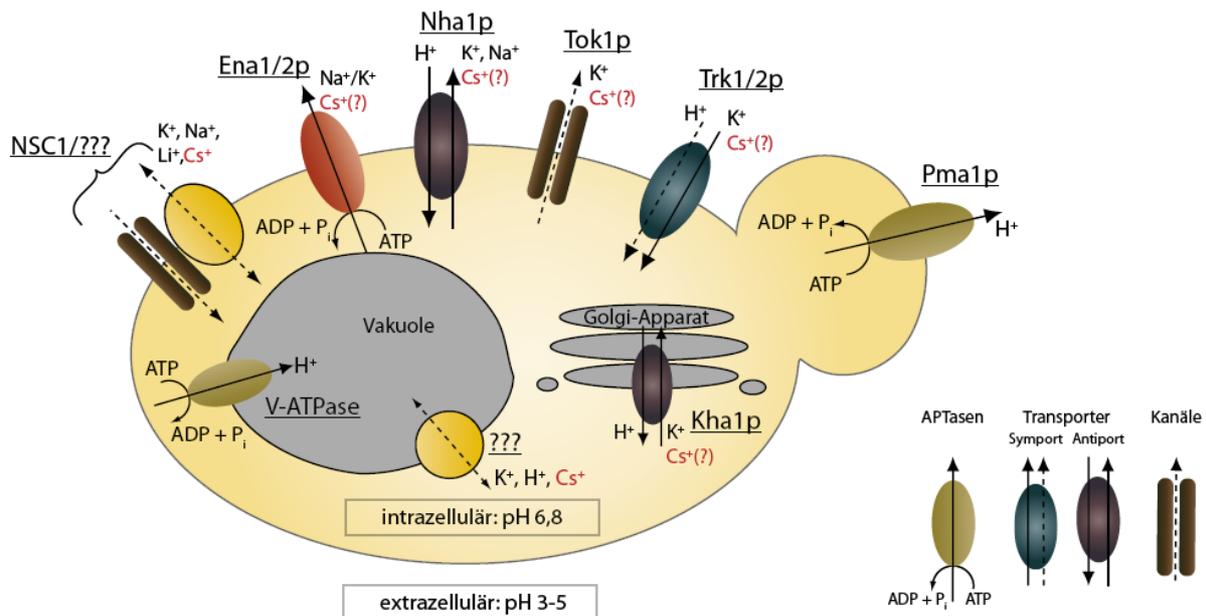


Abbildung 1.9

Kaliumtransportwege in der Hefe

Die K-Aufnahme in die Hefe wird primär durch Trk1p und Trk2p ermöglicht, ihre Aktivität ist an die Funktion der H⁺-ATPase Pma1p geknüpft. Daneben gibt es einen oder mehrere unspezifische Transporter bzw. Kanäle, die den Einstrom von K vermitteln. Die Abgabe von K wird über Tok1p, Nha1p und Ena1/2p bewerkstelligt. Weiterhin ist eine Sequestrierung der K-Ionen in Vakuole oder andere Kompartimente möglich. Bisher konnte jedoch kein Transportprotein mit der Einschleusung von K-Ionen in die Vakuole assoziiert werden. Über welche Routen Cs in die Zelle und wieder heraus gelangt, bleibt spekulativ.

1.4.1.2 K-Abgabe und intrazelluläre Verteilung

Der K-Gehalt der Hefezelle wird jedoch nicht ausschließlich von der Aufnahme des Ions bestimmt. Vielmehr ist das Zusammenspiel von Aufnahme und Abgabe ausschlaggebend für die intrazelluläre K-Konzentration. Die Abgabe von K wird ebenfalls von verschiedenen Transportproteinen vermittelt. Der einzige bisher identifizierte K-spezifische Kanal in der Hefe ist Tok1p. Es handelt sich um einen spannungsabhängigen Kanal, der K bevorzugt ins Medium abgibt („outward rectifying channel“) (Loukin & Saimi 1999). Die Modulation der Tok1p-Aktivität erfolgt durch die externe K-Konzentration ($[K]_{ex}$). Ist diese sehr hoch, findet nur eine sehr langsame Aktivierung des Kanals statt, wohingegen niedrige $[K]_{ex}$ die Aktivierung beschleunigen (Roller et al. 2005). Ob Tok1p eine übergeordnete Rolle im basal stattfindenden K-Ausstrom einnimmt ist nicht gänzlich geklärt. Neben Tok1p gibt es weiterhin einen Na⁺/K⁺/H⁺-Antiporter in der Plasmamembran, Nha1p (Banuelos et al. 1998). Dieser Transporter vermittelt sowohl die Ausschleusung von Na als auch K aus der Hefezelle, wobei im Austausch Protonen aufgenommen werden. Der Transporter ist vor allem bei niedrigen intrazellulären H⁺-Konzentrationen aktiv (Rodriguez-Navarro 2000). Beide Proteine, Tok1p und Nha1p, werden infolge von osmotischem Stress durch die MAP-Kinase Hog1p stimuliert, was zu einer vermehrten Freisetzung von K und Na führt. Sie dienen somit der schnellen Reaktion bei sehr hoher Ionenkonzentration in der Zelle, die zu einer Dissoziation von Proteinen vom Chromatin führen würde. Längerfristig wird durch Hog1p die Transkription weiterer Faktoren stimuliert, die eine Adaption an hohe Salz- und pH-Bedingungen ermöglichen (Proft & Struhl 2004). In diese Klasse fällt eine Familie redundanter P-Typ ATPasen, zu welchen Ena1p und Ena2p gehören, die primär mit der

Ausschleusung von Na aus der Zelle assoziiert wurden (Haro et al. 1991, Garciadeblas et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Ena2p für das Hefewachstum bei sehr hohen pH-Werten oder K-Konzentrationen des Mediums essentiell ist, wodurch angenommen wird, dass diese Pumpe K aktiv aus der Zelle heraus transportiert (Benito et al. 1997, Banuelos & Rodriguez-Navarro 1998).

Zusätzlich gibt es Proteine, die den Transport von K in und aus intrazellulären Kompartimenten vermitteln. Zu dieser Gruppe gehört Kha1p, ein putativer K-Transporter des Golgi-Apparates (Flis et al. 2005). Kha1p ist unter anderem in die pH-Regulation des Golgi-Apparates eingebunden und hat Einfluss auf die Ionenhomöostase der Zelle. Die Deletion von KHA1 führt zu einem erhöhten intrazellulären K-Gehalt, der jedoch nicht auf eine verringerte K-Abgabe zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine stimulierte Aufnahme des Ions (Ramirez et al. 1998).

1.4.1.3 Cs-Aufnahme

In wieweit auch die Cs-Aufnahme und -Abgabe durch oben vorgestellten Proteine vermittelt wird, ist nicht genau beschrieben. Fakt ist, dass Hefezellen Cs aufnehmen und diese Aufnahme abhängig ist vom pH-Wert des Mediums, wobei bei höheren pH mehr Cs aufgenommen wird. Des Weiteren beeinflusst die Präsenz anderer Kationen die Cs-Aufnahme durch kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitionen (Avery 1995). Cs wirkt es seinerseits als Inhibitor der K-Aufnahme. Dabei agiert es in niedrigen Konzentrationen als nicht kompetitiver Inhibitor der K-Aufnahme, wohingegen hohe Cs-Konzentrationen zu einer kompetitiven Inhibition führen (Armstrong & Rothstein 1967, Borst-Pauwels 1981). Diese Fakten deuten auf überlappende Mechanismen bei der Aufnahme monovalenter Kationen, wie K und Cs, hin.

Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass Cs bis zu einem gewissen Maß K funktionell substituieren kann (Aiking & Tempest 1977, Camacho et al. 1981, Ghosh et al. 1993, Sheahan et al. 1993). Durch eine gesteigerte Aufnahme von Cs (bei ungünstigen K/Cs-Verhältnis im Medium) wird unter anderem der K-Gehalt in der Hefezelle dramatisch reduziert und durch Cs ersetzt (Perkins 1993), wodurch es zu Störungen der Ionenhaushaltes und der Osmoregulation kommt. Außerdem ist beschrieben worden, dass Cs in verschiedenen zellulären Prozessen K substituiert, so beispielsweise bei der Aktivierung von Enzymen und bei der Stabilisierung der Ribosomen. Steigt die Cs-Konzentration in der Zelle jedoch zu stark an, kommt es zu einer irreversiblen Dissoziation von Proteinen aus den ribosomalen Untereinheiten (Lerman et al. 1966). Sowohl die Störung in der Ionenhomöostase als auch die Inhibition der Translation können die toxische Wirkung höherer Cs-Konzentrationen erklären.

1.4.2 Calcium-Transport in *Saccharomyces cerevisiae*

Ca ist genau wie K essentiell für die Hefezelle, es liegt im Cytosol jedoch nur in sehr geringen Mengen vor (0,1 μM , (Cunningham & Fink 1994a)). Auf diese Weise verhindert die Zelle eine Aggregation von Ca mit phosphathaltigen Verbindungen im Cytosol und stellt dennoch genügend Ca bereit um verschiedene zelluläre Funktionen aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig nutzt die Zelle Ca aufgrund dieser niedrigen cytosolischen Konzentration als Signalmolekül. Durch transiente Erhöhungen der cytosolischen Ca-Konzentration wird eine Vielzahl von zellulären Prozessen reguliert – wobei sowohl

eine zeitliche als auch räumliche Begrenzung des Signals erzeugt werden kann. In verschiedenen Kompartimenten der Hefezelle wird Ca jedoch in größeren Konzentrationen angereichert, z. B. in der Vakuole sowie im ER bzw. Golgi-Apparat. In der Vakuole beträgt die Ca-Konzentration ca. 1-4 mM, wobei der größte Teil des Ca an anorganische Polyphosphate gebunden vorliegt („nicht austauschbarer Ca-Pool“). Das frei vorliegende Ca erreicht auch hier lediglich eine Konzentration von 30 μM (Dunn et al. 1994). Hefezellen können in Umgebungen mit stark variierenden Ca-Konzentrationen ($[\text{Ca}]_{\text{ex}}$) von 1 μM bis 100 mM wachsen, was einer Differenz um Faktor 100.000 entspricht. Dabei verändert sich der cytosolische Ca-Gehalt bei steigenden Ca-Konzentration im Medium nicht, wogegen sich der nicht austauschbarer Ca-Pool in der Vakuole proportional zu $[\text{Ca}]_{\text{ex}}$ vergrößert.

1.4.2.1 Ca-Homöostase

Die Ca-Homöostase der Hefezelle wird primär von 2 Ca-Pumpen, Pmc1p und Pmr1p, reguliert. Doppelmутanten für beide Proteine sind nicht lebensfähig, da der intrazelluläre Ca-Gehalt dramatisch ansteigt und durch Ca-regulierte Proteine wie Calcineurin eine effektive Sequestrierung des Ca in die Vakuole eingeschränkt wird (Cunningham & Fink 1994a).

Bei Pmc1p handelt es sich um eine putative, hochaffine Ca-ATPase der Vakuole, die nur geringe Ähnlichkeit zu anderen Ca-ATPasen anderer Spezies aufweist. Pmc1 Δ -Zellen weisen einen um 80% reduzierten Ca-Gehalt in der Vakuole auf, was darauf hindeutet, dass Pmc1p maßgeblich für die Ca-Aufnahme in die Vakuole verantwortlich ist (Cunningham & Fink 1994b, Cui et al. 2008). Die zweite Ca-Pumpe, Pmr1p, befindet sich in den Membranen sekretorischer Kompartimente wie ER und Golgi-Apparat. Sie besitzt Homologie zu P-Typ-ATPasen, die auch im menschlichen Muskelgewebe vorkommen. Ihre vornehmliche Funktion ist die Versorgung der sekretorischen Kompartimente mit Ca, was für die Reifung sekretorischer Proteine notwendig ist (Rudolph et al. 1989, Antebi & Fink 1992).

1.4.2.2 Ca-Aufnahme und intrazelluläre Verteilung

Die Aufnahme von Ca in die Hefezelle erfolgt unter anderen durch einen hochaffinen, Ca-permeablen Kanal in der Plasmamembran, der von den beiden Proteinen Cch1p und Mid1p gebildet wird. Beide Proteine wurden erstmals in Zusammenhang mit der Pheromon-abhängigen Ca-Aufnahme beschrieben (Fischer et al. 1997, Locke et al. 2000, Peiter et al. 2005). Nach heutigen Erkenntnissen, dient die Cch1p/Mid1p-Aktivität in erster Linie zur Bereitstellung von Ca für Wachstums- und Sekretionsprozesse (Locke et al. 2000). Neben diesem hochaffinen Kanal sind vermutlich noch weitere Proteine an der Aufnahme von Ca beteiligt, da der Phänotyp der Doppelmутante cch1 Δ mid1 Δ durch hohe Ca-Konzentrationen im Medium unterdrückt werden kann (Peiter et al. 2005).

Ein weiteres Protein, das im Ca-Transport eine Rolle spielt, ist Vcx1p. Hier handelt es sich um einen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter, der wie Pmc1p ebenfalls in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Der Transport von Ca durch Vcx1p ist abhängig vom pH-Gradienten über die Vakuolemembran, der durch die vakuoläre V-ATPase (H^{+} -Pumpe) generiert wird (Cunningham & Fink 1994a, Dunn et al. 1994, Forster & Kane 2000, Cui et al. 2008). Vcx1p besitzt eine eher niedrige Affinität für Ca, die weit oberhalb der cytosolischen Konzentration liegt. Daher liegt die primäre Funktion von Vcx1p in der schnellen

Beseitigung eines Ca-Signals aus dem Cytosol in die Vakuole (Miseta et al. 1999b). In der Vakuole ist ein weiterer Kationenkanal lokalisiert, der in erster Linie den Efflux von Ca, aber auch K und Na ermöglicht – Yvc1p. Erste Arbeiten zu Yvc1p zeigten, dass es die transiente Ca-Freisetzung nach einem hyperosmotischen Schock vermittelt (Denis & Cyert 2002). In Abbildung 1.10 sind die bekannten Transportwege des Ca in und aus der Zelle dargestellt, sowie dessen Verteilung in intrazellulären Kompartimenten.

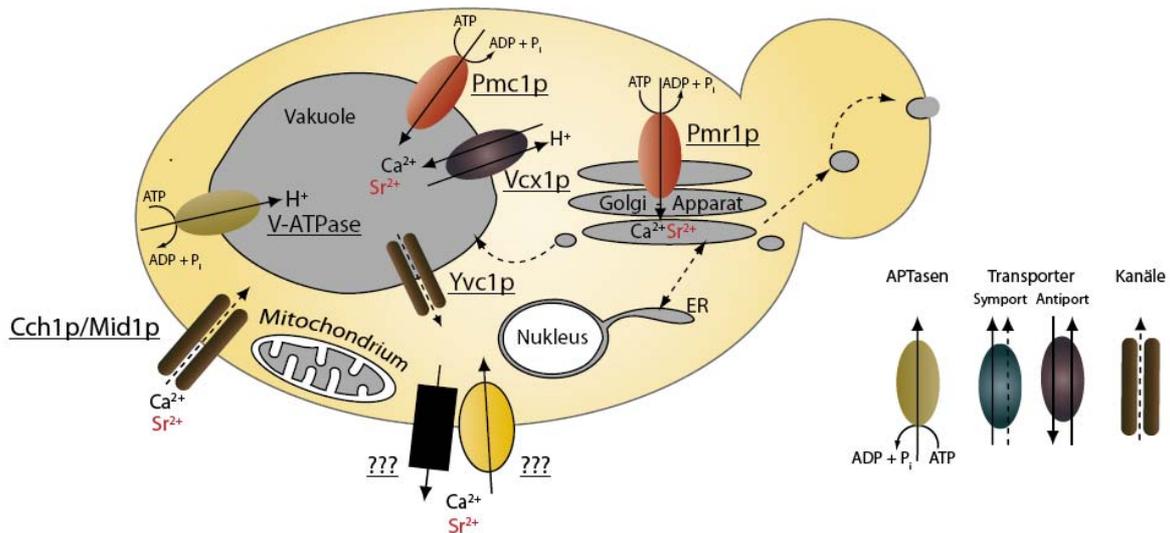


Abbildung 1.10

Ca-Transport in *S. cerevisiae*

Die Aufnahme von Ca in die Hefezelle erfolgt über einen Ca-permeablen Kanal (Cch1p/Mid1p) und über andere, noch nicht beschriebene Transportwege. Der Ca-Gehalt der Zelle wird von den beiden Ca-ATPase Pmr1p und Pmc1p reguliert. Beide Proteine vermitteln die Sequestrierung von Ca-Ionen in intrazelluläre Kompartimente, wie auch der Ca²⁺/H⁺-Antiporter Vcx1p der Vakuole. Die Abgabe des Ca aus der Zelle kann zum einen durch Exocytose erfolgen, andererseits könnten auch noch unbekannte Proteine eine Abgabe ermöglichen. Grau dargestellt sind Kompartimente, die größere Konzentrationen an Ca enthalten.

1.4.2.3 Sr-Aufnahme

Die Aufnahme von Sr in die Hefezellen ist nur sehr unzureichend beschrieben. Kinetiken zur Sr-Aufnahme zeigen jedoch starke Analogien zur Ca-Aufnahme, so dass von ähnlichen Aufnahme- und Regulationsmechanismen für beide Elemente ausgegangen wird (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984). Die Untersuchung der Sr-Aufnahme zeigte außerdem eine Abhängigkeit vom Glucosemetabolismus der Zelle, da die Präsenz von Glucose die Sr-Aufnahme stimuliert. Vergleichbar zu Ca wird auch Sr von negativen Resten der Zellwand stark adsorbiert (Avery et al. 1992).

1.5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll tiefere Einblicke in Aufnahme und Anreicherung von anthropogener Radionukliden in *Saccharomyces cerevisiae* geben. Die Fokussierung liegt dabei auf den Radionukliden ^{137}Cs und ^{90}Sr , da sie i) langlebig sind und so zu einer anhaltenden Belastung des Menschen beitragen und ii) leicht von Organismen aufgenommen werden können.

Die Hefe stellt ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Cs- und Sr-Aufnahme dar, da hier auf zellulärer Ebene nach genetischen Faktoren gesucht werden kann, die diese beeinflussen. Die Aufnahme der beiden Ionen wird im Allgemeinen mit der Aufnahme von K bzw. Ca in Verbindung gebracht. Für diese beiden essentiellen Elemente sind viele Fakten zur Aufnahme und Homöostase in der Hefezelle bekannt.

Die Arbeit mit dem Modellsystem *S. cerevisiae* ermöglicht die Durchführung einer reversen, genetischen Untersuchung, mit der gezielt nach Faktoren gesucht werden kann, die mit der Aufnahme und Anreicherung von Cs und Sr in Verbindung stehen. Inhalt dieser Arbeit ist die Etablierung eines Aufnahme-Assays, der die Untersuchung von ca. 4800 haploiden Mutantenstämmen hinsichtlich ihres Aufnahme- und Anreicherungsverhaltens für die beiden Ionen ermöglicht. Die erhobenen Daten sollen Aufschluss darüber geben, ob Unterschiede in der Aufnahme von Cs und K bzw. Sr und Ca vorhanden sind. Weiterhin sollen anhand der identifizierten Gene funktionelle Pfade/Netzwerke charakterisiert werden, die eine Regulation der Cs- und Sr-Aufnahme bzw. den Weg der Radionuklide in der Zelle beschreiben. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit, ist es einzelne Kandidatenproteine genauer zu charakterisieren, um die Cs- und/oder Sr-Aufnahme eventuell auf molekularer Ebene zu manipulieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Abgene (Hamburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio One (Frickenhausen), Macherey & Nagel (Düren), Neolab (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Ismaning).

Alle Puffersubstanzen und Chemikalien wurden entweder von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) in der Reinheit p.A. bezogen. Aminosäuren und Vitamine, die zur Kultivierung von Hefen verwendet wurden, stammen von Sigma (Taufkirchen) oder Duchefa (Haarlem, Niederlande). Medienbestandteile wurden von Beckton und Dickson (Sparks, USA) bezogen.

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, stammen alle verwendeten Enzyme, dNTPs und Proteinstandards von Fermentas (St. Leon-Roth). Der DNA-Standard (1kb-ladder) wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Radioaktive Chemikalien

Chemikalie	Firma
^{134}Cs (als $^{134}\text{CsCl}$) in 0,1 M HCl, 4,5 MBq (4,5 MBq/ml)	AEA Technology, Braunschweig
^{85}Sr (als $^{85}\text{SrCl}_2$) in 0,5 M HCl, 18,5 MBq (381 MBq/ml)	Perkin Elmer, Boston, USA
^{45}Ca (als $^{45}\text{CaCl}_2$), > 18,5 MBq (74 MBq/ml)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
^{86}Rb (als $^{86}\text{RbCl}$), > 18,5 MBq (74 MBq/ml)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

2.1.3 Geräte

Gerät	Typ-Bezeichnung	Firma
PCR-Gerät	PTC 200	MJ Research, Waltham, USA
Horizontales Elektrophorese-System	Mini-S,M,L	Peqlab, Erlangen
Vertikales Elektrophorese/Blot-System	Protean Tetracell	Biorad, München
Zentrifugen	Hettich 460R	Hettich, Tuttlingen
	Sigma 202-MK	Sigma, Osterode/Harz
	5314	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Beckman	Beckman, Krefeld
Inkubator	BD115	Binder, Tuttlingen
Schüttler	RFI-125S	Infors, Bottmingen, Schweiz
Schüttel-Inkubator	Inkubator1000/Tritramax1000	Heidolph, Schwabach
Wasserbäder	GFL	GFL, Hannover
Analysewaage	Modell ABL	Kern, Balingen
Feinwaage	Modell 527	Kern, Balingen
pH-Mess-System	Inolab 720	WTW, Weilheim/Oberbayern
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer für 96er-Format	Tecan Genios	Tecan, Crailsheim

Gerät	Typ-Bezeichnung	Firma (Fortsetzung)
Gamma-Zähler	Wallac Wizard 1480	Perkin Elmer, Waltham, USA
LSC	Wallac Quantulus 1220	Perkin Elmer, Waltham, USA
Mikroskop	Zeiss LSM 510	Carl Zeiss, Jena

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurde von Metabion (Martinsried) hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Beschreibung
P001_U1_f	GATGTCCACGAGGTCTCT	Amplifizierung KanMX-Kassette: Verifizierung der Mutanten
P002_D1_r	CGGTGTCGGTCTCGTAG	Amplifizierung KanMX-Kassette: Verifizierung der Mutanten
P003_kanB_r	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Sequenzierung: Verifizierung der Mutanten
P004_kanC3_f	CCTCGACATCATCTGCCAGAT	Sequenzierung: Verifizierung der Mutanten
P009_HA3tag_f	AGGGCCCTGCAGGTACCCATACGATGTTCCAG ATTACGCTTAAGAGGGCCGCATCATGTAATT	Klonierung: HA in pCM189
P010_HA3tag_r	GGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG	Klonierung: HA in pCM189
P047_ha3ydr090c_f	CATTGAAGGATCCATGATCT CTGAAAAGGCTGC	Klonierung: YDR090C-pCM189
P048_ha3ydr090c_r	TAATCCTGCAGGCCACACTT AGCCTCGAATAAC	Klonierung: YDR090C-pCM189
P043_seqprim_f	CTTTCCTTATACATTAGGTCCTTTG	Sequenzierung
P083_seq_rev	GGGACCTAGACTTCAGGTTG	Sequenzierung
P119_ydr090c_sonde1	GTAGCTGCTATTATTGCGGCTGA	Sonde Northern Blot
P120_ydr090c_sonde2	GCAAAGCTCGAAGCATCGTC	Sonde Northern Blot
P005_ACT1_f	GTTCCAGCCTTCTACGTTTCC	Sonde Northern Blot
P006_ACT1_r	ATTCTTACGGACATCGACATCAC	Sonde Northern Blot
P138_3xHA-CT_rev	CATGATGCGGCCCTTTAAGCGT AATCTGGAACGTC	Klonierung 3xHA
P139_pCM189-CT_fw	GACGTTCCAGATTACGCTTAAAG GGCCGCATCATG	Klonierung 3xHA
P140_3xHA-CT_fw	GATCGACCTGCAGGTACCCATACGATGTT	Klonierung 3xHA
P163_YDR090C_endo_fw	CTGAGTggtaccTCCAAGAATGCTCACGCAAG	Klonierung YDR090C-YEp352
P164_YDR090C_endo_rev	CTGAGTctgcagCGGAATTTTCATCAACCGCAC	Klonierung YDR090C-YEp352
P170_yEGFP-Pstl_fwd	AGTCAGTCCTGCAGGATGTCTAAAGG TGAAGAATTATTAC	Klonierung yGFP
P171_yEGFP-Pstl_rev	CTGACGACTGCAGAGTTTGTACAATT CATCCATACCATGG	Klonierung yGFP

2.1.5 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pCM189	Tetracyclin-regulierbarer Expressionsvektor	EUROSCARF (Gari et al. 1997)
YEp352	Hefe./E.coli-Shuttle-Vektor	Kin clova-Zimmermanova, Prag (Hill et al. 1986)
pSH012	pCM189::YDR090C-HA	diese Arbeit
pSH060	YEp352::Prom _{YDR090C} -YDR090C-HA ₃ -Term _{CYC}	diese Arbeit
pSH071	YEp352::Prom _{YDR090C} -YDR090C-yGFP-HA ₃ -Term _{CYC}	diese Arbeit

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung	Firma
Anti-HA (H 6908)	Kanninchen	1:1000	Sigma
Anti-Pma1 (40B7)	Maus	1:1000	Santa Cruz
Anti-Dmp1 (5C5)	Maus	1:1000	Molecular Probes
Anti-Pep12 (2C3)	Maus	1:1000	Molecular Probes
Anti-V-ATPase (10D7)	Maus	1:1000	Molecular Probes
Anti-OxlIII (DA5)	Maus	1:500	Molecular Probes
Sekundäre Antikörper	Quelle	Verdünnung	
Anti-Kanninchen (A 6154)	Ziege	1:10000	Sigma
Anti-Maus (170-6516)	Ziege	1:3000	Bio-Rad

2.1.7 E. coli-Stämme

Stamm	Beschreibung
XL 1 blue (Molekularbiologie)	hsd R17 rec A1 end A1 gyrA46 thi-1 sup E44 relA1 lac [F' pro AB lacIqZ ^q ΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene)

2.1.8 S. cerevisiae-Stämme

Stamm	Beschreibung
BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0

Alle verwendeten Mutanten stammen von Wildtyp BY4741 ab und sind über EUROSCARF (Frankfurt/Main) erhältlich. Die Mutanten wurden generiert, indem ein definiertes Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde („*genXΔ::KanMX4*“) (Brachmann et al. 1998, Winzeler et al. 1999, Kumar & Snyder 2001). Jede Mutante ist durch zwei individuelle Tags (20 bp-Sequenzen) identifizierbar, die die Kanamycin-Kassette flankieren. Für die vorliegende Arbeit wurde die komplette, haploide Hefemutantenkollektion mit 4862 verschiedenen Stämmen erworben (Stand 2005).

2.2 Methoden

Molekularbiologische Arbeiten wie z. B. Restriktionsanalysen, Ligationen und die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden soweit nicht anders angegeben gemäß den Standardmethoden aus Sambrook et al durchgeführt (Sambrook & Russel 2000). Enzyme und kommerzielle Kits wurden wie in den Herstellerangaben beschrieben, verwendet.

2.2.1 *E. coli*-Techniken

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

E. coli-Zellen wurden bei 37°C in LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 17 mM NaCl) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 herangezogen und anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten mit gekühlten Reagenzien und Materialien bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden absedimentiert (3000 rpm, 4°C, 5 min) und in einem Fünftel des Originalvolumens 100 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden erneut absedimentiert (3000 rpm, 4°C, 5 min) und in 50 mM CaCl₂ + 15 % Glycerin resuspendiert (1/25 des Originalvolumens). Die so präparierten Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, anschließend zu 50, 100 und 200 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetente *E. colis* erfolgte bei -80°C.

2.2.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Die kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 50-100 µl Zellsuspension wurden mit der DNA (Ligationsmix oder Plasmid, max. 1/10 des Zellsuspensions-Volumen) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock der *E. coli*-Zellen durch eine 1-minütige Inkubation in einem 42°C-Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen weitere 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 0,2 bis 1 ml LB- oder SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) zu den Zellen gegeben und diese bei 37°C regeneriert (30-60 min). 50-200 µl der Zellsuspension wurden auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen (in der Regel LB-Agar + 100 µg/ml Ampicillin). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass sich einzelne Kolonien ausbilden konnten. Einzelne Kolonien wurden mit Hilfe von Kolonie-PCRs und Restriktionsanalysen untersucht. Positive Klone wurden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft um Plasmid-DNA für weiterführende Arbeiten zu erhalten.

2.2.1.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen oder die Transformation von Hefezellen erfolgt entweder durch Alkalische Lyse (Sambrook & Russel 2000) oder wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (*Nucleospin Plasmid Mini Kit*, Machery-Nagel) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2 *S. cerevisiae*-Techniken

2.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zelldichte einer Hefekultur wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt, dabei entspricht 1 OD ca. 2×10^7 Zellen/ml. Zur Bestimmung der Zelldichte für die genomweiten Analyse wurde ein 96 Proben-Photometer verwendet

(Genios, Tecan, Crailsheim), mit einer Umrechnung von $1 \text{ OD} = 8 \times 10^7$ Zellen/ml. Gemessen wurden im einem OD-Bereich von 0,2-0,75.

2.2.2.2 Kultivierung von Hefen und Anlegen von Dauerkulturen

Hefezellen wurden entweder in Voll- (YPD) oder synthetischen Medium (SD oder SC) bei 30°C kultiviert. YPD enthält 1% Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2% Glucose. SD und SC-Medium wurden mit 0,17 % YNB ohne Aminosäuren und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 2 % Glucose hergestellt, denen entweder ausschließlich die Zusätze für die Auxotrophien hinzugefügt wurden (SD) oder ein SC-drop out-Mix (SC), die die zu selektierende Komponente nicht enthielt. Um Agar-Platten herzustellen wurden den Medien 2 % Bacto-Agar zugesetzt. Das Antibiotikum G418 (Merck Biosciences (Calbiochem), Darmstadt) wurde zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben.

Zur Dauerlagerung der Hefezellen wurden diese in YPD oder SD über Nacht kultiviert. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15% versetzt. Nach dem Schockfrieren in flüssigen Stickstoff wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae*

Zur Extraktion genomischer DNA wurden 5 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die Zellen wurden absedimentiert und in 100 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8, 50 mM Glucose) resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurden 200 µl Lösung II (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und durch invertieren gemischt. Anschließend wurden 2/3 Volumen Glasperlen (\varnothing 0,25-0,5 mm, Roth) zugegeben und 8 min gevortext. Nach dem Absedimentieren (2 min bei 13500 rpm, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 150 µl Lösung III (3M Na-Acetat pH4,8) zugegeben, invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde absedimentiert und der Überstand mit 400 µl Isopropanol versetzt, um die DNA zu fällen (10 min bei -20°C). Die gefällte DNA wurde absedimentiert (5 min, 13500 rpm, 4°C), mit 80 %-igen Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Präzipitat wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die gewonnene DNA wurde 1:100 verdünnt für PCR-Reaktionen verwendet.

2.2.2.4 RNA-Isolierung aus *S. cerevisiae*

Die Isolation von RNA erfolgte für 25-50 OD-Einheiten Zellen. Die Zellen wurden absedimentiert und mit H_2O dest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl AE-Puffer (50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 5,3) resuspendiert und mit 40 µl 10 %-iger SDS-Lösung versetzt. Zur Zellsuspension wurden 440 µl AE-equilibriertes Phenol (Phenol mit pH 5,3) zugegeben, gut gemischt (Vortexer) und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Extraktionslösung mithilfe eines Trockeneis/Ethanol-Bades soweit abgekühlt, bis das Phenol kristallisierte. Die Lösung wurde absedimentiert (2 min, 13500 rpm, RT) und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde mit 400 µl Chloroform gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,3 sowie 2,5 Volumen Ethanol abs. gefällt (mind. 1h bei -20°C). Das

RNA-Präzipitat wurde mit 80 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 20-50 µl DEPC-behandeltem H₂O dest. aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte für kürzere Zeiträume bei -20°C, ansonsten bei -80°C.

2.2.2.5 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Für die Gewinnung von analytischen Proteinextrakten aus Hefe wurden ca. 2 OD Zellen verwendet. Die Zellen wurden absedimentiert und mit H₂O dest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl H₂O dest. aufgenommen und die Zellsuspension wurde mit 30 µl NaOH/BME (1,85 M NaOH, 7,5% β-Mercaptoethanol) gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden 30 µl 55%-iger Trichloressigsäure zugegeben, gemischt und die Proben weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine 10 min bei 13000 rpm/4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 50 µl HU-Puffer gelöst (8 M Harnstoff, 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 mM EDTA, 5 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau; 1,5 % DTT; dem Puffer wurde erst direkt vor Verwendung das DTT zugesetzt). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 10 min bei 65°C inkubiert und die unlöslichen Zellfragmente absedimentiert. 10-20 µl der Probe wurden für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Experimente verwendet.

2.2.2.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen wurden nach der Lithiumacetat/ssDNA-Methode von Gietz et al. (Gietz & Woods 2002) durchgeführt. Kurz zusammengefasst, wurden Hefezellen in der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^7 Zellen/ml) geerntet, das Medium entfernt und 1x mit H₂O dest. und 1x mit 100 mM Lithiumacetat gewaschen. Pro Transformation wurden 2×10^8 Zellen verwendet, zu denen folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben wurden (Tabelle 2.1). Anschließend wurde der gesamte Ansatz gut gemischt.

Transformationsmix

1. PEG 3500 50% (w/v)	240 µl
2. 1.0 M Lithiumacetat	36 µl
3. Carrier ssDNA (2 mg/ml)	50 µl
4. Plasmid-DNA (0.1-1 µg) plus H ₂ O dest.	34 µl
Gesamtvolumen	360 µl

Tabelle 2.1
Zusammen setzung eines Transformationsansatzes

Die Zellen wurden mit dem Transformationsmix 15 min bei 30°C inkubiert, danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 40-60 min. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsmix entfernt. Wurde ein Auxothrophie-Marker verwendet, konnten die Hefezellen in H₂O dest. resuspendiert und sofort auf SD-Agar (ohne die zu selektierende Aminosäure oder Base) ausplattiert werden. Wurde hingegen auf ein Antibiotikum selektiert, sind die Hefezellen in YPD resuspendiert und ca. 4 h bei 30°C inkubiert worden. Anschließend wurden sie auf YPD-Agar mit dem betreffenden Antibiotikum ausplattiert. Transformierte Hefestämme konnten nach Inkubation der Platten für 2-4 Tagen bei 30°C identifiziert werden.

2.2.3 PCR-Techniken

2.2.3.1 PCR, allgemein

PCR-Reaktionen wurden mit Taq-Polymerase (NEB, Frankfurt) durchgeführt, wenn analytische Arbeiten vorlagen. Die Synthese von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurden mit Pfu-Polymerase durchgeführt (Fermentas, St. Leon-Roth). Die Zusammensetzung und Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte nach den Herstellerangaben und ist kurz in Abbildung 2.1 zusammengefasst.

Komponente	Zusammensetzung	PCR-Programm	
Reaktionspuffer	1x	1 Zyklus 94°C 2 min	
dNTP-Mix	0,2 mM pro dNTP	94°C 15 sec	
Primer I	0,1 - 0,2 µM	25-35 Zyklen	
Primer II	0,1 - 0,2 µM		55°C 15-30 sec
Ausgangs-DNA	5 pg - 1 µg		72°C 1 min/1kb Taq 2 min/1kb Pfu
Polymerase	0,025 U/µl	1 Zyklus 72°C 10 min	
H2O dest.	variabel	1 Zyklus 4°C variabel	

Abbildung 2.1: PCR-Zusammensetzung und Ablauf der PCR-Reaktionen

2.2.3.2 Kolonie-PCR

Die PCR wurde im 5 µl-Maßstab durchgeführt. Mit einem Zahnstocher wurde Zellmaterial von den zu untersuchenden Kolonien in den PCR-Mix transferiert und gemischt. Vor der eigentlichen PCR (siehe 2.2.3.1) wurde das gesamte Reaktionsgemisch für 5 min auf 95°C erhitzt, um die Zellen aufzuschließen.

2.2.3.3 Sequenzierungsreaktionen

Sequenzierungen wurden im Genomanalyse-Zentrum (Helmholtz Zentrum München) mit einem *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden selbstständig in 48er- bzw. 96er-Reaktionsplatten angesetzt und aufgearbeitet. Für die Sequenzierungsreaktionen wurde entweder aufgereinigtes PCR-Produkt (Verifizierung der Mutantenstämme) oder Plasmid-DNA (Klonierungen) verwendet. Pro Reaktion wurde die Menge der Ausgangs-DNA wie folgt berechnet: **Ausgangs-DNA [ng] = Ausgangs-DNA [bp] / 100**

Die Sequenzierungsreaktionen wurden im 5 µl-Maßstab nach folgenden Schema (Abb. 2.2) durchgeführt:

PCR-Zusammensetzung	PCR-Programm	
0,5 µl BigDye Terminator 3.1 ready	95°C 1 min	
1,0 µl Primer	95°C 30 sec	
1,0 µl 5x BDT-Puffer	50°C 15 sec	35 x
0,5 µl HPLC-Wasser	60°C 4 min	
2,0 µl DNA	4°C Bis zur Verwendung	

Abbildung 2.2: Zusammensetzung der Sequenzierreaktion und PCR-Protokoll

Nach erfolgter PCR wurden die Sequenzierungsreaktionen mit 0,5 µl einer Lösung mit 62,5 mM EDTA und 1,5 M Natriumacetat und 15 µl 100 % Ethanol versetzt. Nach dem Mischen wurden die Reaktionen in eine neue Mikrotiterplatte transferiert und 30 min bei 4°C zentrifugiert (3000 g). Die präzipitierte DNA wurde einmal mit 80% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde durch 5 sec Zentrifugieren der umgedrehten Platte entfernt. Die getrocknete DNA wurde in 55 µl HPLC-Wasser aufgenommen und jeweils 27 µl pro Probe für die Sequenzierung verwendet. Sollte die Sequenzierung erst später erfolgen, wurden die Präzipitate bei -20°C im Dunkeln gelagert und erst vor der Verwendung resuspendiert.

2.2.4 Western Blot

SDS-Gelelektrophorese wurde gemäß Laemmli mit dem *Mini Protean Tetra Cell System* (Biorad, München) durchgeführt (Laemmli 1970). Proteine wurden durch das Nassblot-Verfahren auf PVDF-Membranen (Roti-PVDF, Roth, Karlsruhe) transferiert (Puffer: 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % Methanol, pH 9,9; 1h bei 100V). Nach dem Blotten wurden die Proteine gegebenenfalls mit Ponceau zur Markierung des Markers angefärbt. Die PVDF-Membran wurde in PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,5% Tween 20, pH 7,4) + 5 % Magermilch für mindestens 1 h blockiert, um unspezifische Antikörperreaktionen zu unterbinden. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran kurz mit PBST gespült und anschließend mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBST, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 5 Waschschritten à 5 min mit PBST wurde der zweite Antikörper (HRP-gekoppelt) verdünnt in Blockierungspuffer (PBST + 5 % Magermilch) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten erfolgte die Visualisierung der Antikörpermarkierten Proteine durch ECL-Reaktionen (*enhanced chemiluminescence*). Dazu wurde zur Membran eine ECL-Entwicklerlösung, bestehend aus zwei Komponenten gegeben (Komponente A: 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,4 mM p-Cumarsäure, 2,5 mM Luminol und Komponente B: 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,02 % H₂O₂). Nach einminütiger Inkubation wurde die Chemilumineszenz durch Exposition eines lichtsensitiven Films (Lumi-Film, Roche, Mannheim) sichtbar gemacht.

2.2.5 Northern Blot

2.2.5.1 Herstellung von DIG-markierten Sonden

Northern Blot-Analysen wurden mit DIG-markierten DNA-Sonden durchgeführt. Dabei wurde das *DIG high Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche, Mannheim) verwendet. Die Herstellung und der Test der Sonden erfolgten gemäß dem mitgelieferten Protokoll.

2.2.5.2 RNA-Gelelektrophorese und Blotten

Die Auftrennung der RNA erfolgte über Formaldehyd-Agarosegele (20 mM MOPS, 3 % (v/v) Formaldehyd, 1 % Agarose, 3 µg/ml Ethidiumbromid). Pro Probe wurden 12 µg RNA verwendet, die vor dem Auftragen 10 min bei 65°C denaturiert wurde. Die Auftrennung erfolgte für 2 h bei 80 V. Anschließend wurde das Gel in SSC-Puffer gewaschen, um verbliebenes Formaldehyd zu beseitigen.

Die Übertragung der RNA auf Nitrocellulosemembranen erfolgte mittels Kapillar-Blot wie in Sambrook et al beschrieben (Sambrook & Russel 2000). Als Transferpuffer wurde 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7) verwendet. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Im Anschluss wurde die RNA mit der Membran mittels UV-Bestrahlung (Programm: Auto-UV-Crosslink, 1200 J) quervernetzt (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

2.2.5.3 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektion der DIG-markierten Sonden auf den Nitrocellulosemembranen wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt (*DIG Application Manual for Filter Hybridization*, Roche). Kurz zusammengefasst wurde die Nitrocellulosemembran in *DIG Easy Hyb*-Puffer prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der DIG-markierten DNA-Sonden über Nacht bei 50°C im Wasserbad (mit 25 ng/ml markierte Sonden-DNA in *DIG Easy Hyb*-Puffer). Die Membran wurde dafür in Hybridisierungsbeutel eingeschweißt, um das Volumen des Puffers zu minimieren. Nach mehreren Waschschritten mit 2x SSC + 0,1 % SDS und 0,1x SSC + 0,1 % SDS erfolgte die immunologische Detektion der Sonden auf der Membran durch Antikörper, die gegen DIG gerichtet waren. Durch die Zugabe von CSPD, einem Substrat für die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase, wurden Chemilumineszenz-Signale erzeugt, die durch Exposition lichtempfindlicher Filme sichtbar gemacht wurden (30 min Expositionszeit).

Zum Testen verschiedener DIG-markierten Sonden an einer Nitrocellulosemembran wurden diese zwischen den einzelnen Nachweisen mit heißen 0,1 % SDS „gestrippt“ (15 min unter leichten Schwenken) und nach ausgiebigen Waschen mit 2x SSC erneut nach dem Detektionsprotokoll behandelt. Dabei wurden Sonden, die schwache Signale erzeugten zuerst getestet, gefolgt von Sonden, die zu stärkeren Signalen führten.

2.2.6 Aufnahme-Assay für Cs, Sr, Rb und Ca

Für den Aufnahme-Assay wurden Hefezellen in YPD oder SC-Medium für 2-3 Tage kultiviert. Von diesen Vorkulturen wurden neue Kulturen angeimpft, mit denen die Aufnahmeversuche durchgeführt wurden.

2.2.6.1 Standard-Assay mit Cs und Sr

Die genomweite Untersuchung wurde im 96er-Format (*96-deepwell plates*, Abgene) durchgeführt. Dazu wurden von den Vorkulturen jeweils 1,3 ml YPD- oder SC-Medium zu einer Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml angeimpft. Diese Zellen wurden bis zu spätlogarithmischen Phase herangezogen (ca. 5×10^7 Zellen/ml) und von 200 µl dieser Zellsuspensionen die Zellzahl photometrisch bestimmt (siehe 2.2.2.1). Anschließend wurden $2-4 \times 10^7$ Zellen pro Probe absedimentiert, zweimal mit H₂O dest. gewaschen und in 100 µl Assay-Puffer (Standardbedingungen: 50 mM HEPES pH 7 + 2 % Glucose) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Regenerationsphase (30°C, 200 rpm) wurde gleiche Volumina der Zellsuspension und von einem radioaktiv markierten Assay-Puffer in vorgespülten Filterplatten (*Multiscreen_{HTS}* (HA), Millipore, Molsheim, Frankreich) vereinigt, so dass unter Standardbedingungen folgende Zusammensetzung vorlag: $\sim 1,5 \times 10^8$ Zellen/ml in 50 mM HEPES pH 7 + 2% Glucose, je 0,05

mM CsCl und SrCl₂, sowie je 4 kBq/ml Cs¹³⁴ und Sr⁸⁵). Die Anreicherung von Cs und Sr durch die Hefezellen erfolgte über 13 h hinweg bei 30°C und 200 rpm. Anschließend wurden die Zellen abfiltriert (*MultiScreen_{HTS} Vacuum Manifold*, Millipore) und zweimal mit 50 mM HEPES pH 7 gewaschen. Die Filter wurden aus der Platte in Zählröhrchen (Perkin Elmer, Waltham, USA) ausgestanzt (*MultiScreen Multiple Punch*, Millipore) und mit einem Gamma-Zähler (*Wallac Wizard 1480 Automatic Gamma Counter*, Perkin Elmer) vermessen, um die zelluläre vorliegende Cs- und Sr-Aktivität zu ermitteln. Messungen bei anderen pH-Bedingungen erfolgten in gleicher Weise, lediglich die Puffersubstanz und Konzentration variierte (in den Ergebnissen angegeben). Komplementierte Hefenstämmen wurden für den Assay in SC-Medium herangezogen. Wurde ein Tet-regulierbare Promotor für die Expression verwendet, ist Doxycyclin in den jeweils angegebenen Konzentrationen (0,1 bis 10 µg/ml) zugegeben worden (sowohl bei der Kultivierung als auch beim Assay).

2.2.6.2 Bestimmung der γ -Aktivität mit dem Wallac Wizard 1480

Die Messung von ¹³⁴Cs und ⁸⁵Sr konnte gleichzeitig erfolgen, da die Energiespektren beider Isotope so unterschiedlich sind, dass diese im Messmodus MIA („multiple isotope counting“) auseinander gerechnet werden können (siehe Abb. 2.3). Die Messzeit wurde so gewählt (15 min/Probe), dass der errechnete Messfehler des Gerätes unter 1 % lag. Hintergrundstrahlung wurde automatisch von den Messergebnissen abgezogen, basierend auf den Daten von regelmäßig durchgeführten Hintergrundmessungen. Von den Rohdaten wurde anschließend die Negativkontrolle (Filter von Proben mit radioaktiv markiertem Assay-Puffer) abgezogen. Messungen von nicht radioaktiv markierten Hefeproben und Puffer lagen im Bereich der Hintergrundstrahlung.

Einzelmessungen von ¹³⁴Cs oder ⁸⁵Sr wurden im Messmodus RATIO durchgeführt, auch hier wurde die Messzeit so optimiert, dass eine Minimierung des Messfehlers erreicht wurde (12 – 15 min/Probe).

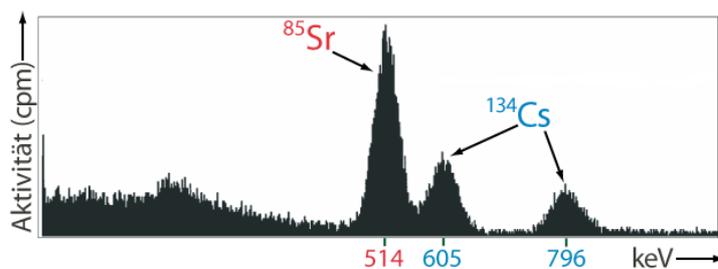


Abbildung 2.3

Energiespektrum einer ¹³⁴Cs/⁸⁵Sr-Probe

⁸⁵Sr weist bei 514 keV und ¹³⁴Cs bei 605 und 796 keV Energiemaxima auf. Aufgrund von Normalisierungsmessungen mit ¹³⁴Cs oder ⁸⁵Sr, ist das Messprogramm in der Lage die einzelnen Maxima verschiedenen Isotopen zuzuordnen und einzeln zu berechnen.

2.2.6.3 Kinetik-Experimente

Im Rahmen der Kinetik-Experimente wurden Cs- und Sr-Konzentrationen von 0,05 bis zu 100 mM untersucht. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie oben beschrieben, allerdings wurden größere Volumina von Zellen angeimpft und bearbeitet (~ 25 ml je nach Probenanzahl). Die Aufnahme von Cs und Sr wurde mit der Zugabe der Zellen zum radioaktiven Puffer gestartet (für 12 Messpunkte: 600 µl radioaktiver Assay-Puffer plus 600 µl Zellsuspension), wobei die gleiche Zusammensetzung wie im Standard-Assay vorlag: 1,5x10⁸ Zellen/ml in 50 mM HEPES pH 7 + 2 % Glucose. Die Konzentration

Konzentration von CsCl oder SrCl ₂	Aktivität von ¹³⁴ Cs oder ⁸⁵ Sr
0,05 mM	4 kBq/ml
0,5 mM	4 kBq/ml
1 mM	4 kBq/ml
5 mM	8 kBq/ml
10 mM	16 kBq/ml
20 mM	32 kBq/ml
50 mM	80 kBq/ml
100 mM	160 kBq/ml

des zugegebenen CsCl und SrCl₂ und die entsprechende Aktivität der Tracerelemente ist Tabelle 2.2 zu entnehmen. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden Aliquots zu je 80 µl abgenommen und sofort abfiltriert sowie zweimal mit 50 mM HEPES pH 7 gewaschen. Die Messung der ¹³⁴Cs- und ⁸⁵Sr-Aktivität erfolgte im *MIA-Modus* für 15 min/Probe.

Tabelle 2.2 Kinetik-Experiment

2.2.6.4 Aufnahme-Assay mit Ca und Rb

Die Untersuchung der Ca- und Rb-Aufnahme erfolgte analog zum oben beschriebenen Standard-Assay mit Cs und Sr. Soweit nicht anders angegeben, wurden immer 0,05 mM des jeweiligen Chloridsalzes verwendet (CaCl₂, RbCl). Im Falle der Rb-Messungen mussten 50 kBq/ml des radioaktiven Tracers ⁸⁶Rb zugesetzt werden, um gut messbare Ergebnisse mit dem Gamma-Zähler zu erhalten. Die Proben wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben für die Messungen präpariert.

In den Messungen zur Ca-Anreicherung wurde ⁴⁵Ca als Tracer verwendet (4 kBq/ml), bei dem es sich um einen reinen β-Strahler handelt. Dementsprechend mussten die Proben anders aufgearbeitet werden, da die Bestimmung der Aktivität mittels LSC (*Liquid Scintillation Counting*) durchgeführt wurden. Der Assay wurde wie für Cs und Sr durchgeführt. Anschließend wurden die Filter mit den Zellen in LSC-Röhrchen (Minis R1000, Zinsser Analytic, Frankfurt) ausgestanzt. Die Filter und Zellen wurden durch Zugabe von 50 µl konzentrierter HNO₃ und einer 20 minütigen Inkubation bei 50°C (unter den Abzug) verätzt. Anschließend wurden 500 µl H₂O dest. zugegeben, um die Säure zu verdünnen. Zu dem so aufgeschlossenen Zellmaterial wurden 4 ml vom LSC-Cocktail Ultima Gold AB (Perkin Elmer, Waltham, USA) zugegeben und kräftig vermischt. Anschließend wurden die Proben mit einem *Wallac Quantulus 1220 low level* LSC (Perkin Elmer) gemessen. Da es ebenfalls möglich war die Ca- und Sr-Aktivität nacheinander in einer Probe zu bestimmen, wurde die Ca-Aktivität in einem begrenzten Messbereich aufgezeichnet (265-575 keV, 15 min/Probe), so dass die Sr-Aktivität vernachlässigt werden konnte. Ca hingegen beeinträchtigte eine anschließende Bestimmung der Sr-Aktivität mit dem Gamma-Zähler nicht.

2.2.7 Bestimmung des zellulären K- und Ca-Gehalt von *S. cerevisiae*

Von ausgewählten Hefestämmen wurden 20 ml-Kulturen in YPD angesetzt und 20 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf Eis gestellt und die Zellzahl bestimmt. Pro Probe wurden ungefähr 3x10⁹ Zellen auf einem Filter mit 0,45 µm Porengröße (*MF-Millipore Membrane Filters*, Millipore) abgeschieden und jeweils dreimal mit 10 ml einer 10 µM EDTA-Lösung und mit 10 ml H₂O dest. gewaschen. Sowohl Filter als auch Zellmaterial wurden in 2 ml 30%-iger HNO₃ (destilliert) über Nacht bei 65°C vollständig verätzt. Diese Lösung wurde anschließend mit 4 ml H₂O dest. versetzt (Endkonzentration 10 % HNO₃), abzentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dabei wurde das Volumen der Lösung für die spätere Berechnung der Konzentrationen registriert.

Sowohl die K- und Ca-Konzentration vom YPD-Medium, des verwendeten Wassers, der Säure und der genutzten Filter wurden bestimmt, um die Blindwerte zu erhalten. Die Bestimmung der Ionengehalte wurde immer in 10 %-iger HNO_3 durchgeführt.

Die Messung des K- und Ca-Gehalts wurde am Institut für ökologische Chemie des Helmholtz Zentrum Münchens durchgeführt (Zentrale Anorganische Analytik; Univ. Doz. Dr. Michalke). Die Elementaranalyse erfolgte mittels ICP-OES an einem „Spectro Ciros Vision“-System (SPECTRO Analytical Instruments GmbH & Co. KG, Kleve, Germany). Die gemessenen Spektrallinien für die zu untersuchenden Elemente betragen 396.847 nm für Ca und 766.490 nm für K.

2.2.8 Toxizitätstest

Die Untersuchung hinsichtlich der Toxizität verschiedener mono- und divalenter Kationen erfolgte durch Tropftests auf YPD- oder SD-Agarplatten. Dabei wurden die angegebenen Salzkonzentrationen bis auf K und Na erst nach dem Autoklavieren eingestellt (Verwendung steriler Salzlösungen und 2x YDP- oder SD-Agar). Die Hefezellen wurden über Nacht im geeigneten Medium kultiviert. Anschließend wurde die OD_{600} bestimmt. Die Zellen wurden zweimal mit H_2O dest. gewaschen und in diesem auch auf die gewünschte OD_{600} verdünnt (OD 0,1 bis 0,3). Von den einzelnen Zellsuspensionen wurden Verdünnungsreihen angelegt und mit einer Mehrkanalpipette je 4 μl pro Probe (und Verdünnung) auf Agarplatten mit verschiedenen Salzkonzentrationen aufgetragen. Die Zellsuspension wurde auf dem Agar angetrocknet und die Platten anschließend für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte nach dem Einscannen der Platten mithilfe von Bildbearbeitungsprogrammen (Adobe Photoshop).

2.2.9 GFP-Fluoreszenz-Mikroskopie

Hefezellen wurden bis zur mittel-logarithmischen Phase herangezogen (OD 0,5-0,8) und mit H_2O dest. gewaschen. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht und leicht antrocknen gelassen. Die Visualisierung der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung eines 63x Plan-Apochromat Objektivs (1,4 Öl) bei 488 nm und dem Filter BP 535-590 IR. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der *Zeiss LSM Image Browser* (Zeiss AIM 4.2, Carl Zeiss, Jena).

2.2.10 Membranfraktionierung

1000 ml Hefezellen wurden in SD-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 1 bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen absedimentiert (4 min, 5000 rpm, RT) und einmal mit H_2O dest. gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 100 ml DTT-Puffer (100 mM Tris, 10 mM DTT, pH 9,4; frisch angesetzt) resuspendiert und in einen 500 ml Kolben überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation in einem 30°C-Wasserbad wurden die Zellen erneut geerntet und einmal mit 50 ml Spheroblasten-Puffer gewaschen (SD-Medium, 1,2 M Sorbitol, 5 mM MES, pH 6,9). Die Zellen wurden erneut in Spheroblasten-Puffer resuspendiert, dem diesmal jedoch 0,1 mg/ml Zymolase (T20

Zymolyse, USBIO) zugesetzt wurde. Diese Zellsuspension wurde in einem 300 ml-Kolben für 30-60 min im Wasserbad inkubiert und die Spheroblastenbildung unter dem Mikroskop verfolgt.

Die erzeugten Spheroblasten wurden sedimentiert (5 min, 2000 rpm, 4°C) und zweimal mit eiskaltem Spheroblasten-Puffer (ohne Zymolase) gewaschen. Anschließend wurden diese Zellen in 4 ml hypo-osmotischen Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 200 mM Sorbitol, 5 µM Leupeptin, 1,54 µM Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM DTT) resuspendiert. Die Lyse der Zelle erfolgte in eine Dounce-Homogenisator durch 15 Kolbenbewegungen. Die lysierten Zellen wurden 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Rückstand (P1) wurde aufgehoben und der Überstand bei 13000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Wiederum wurde das Sediment (P2) aufgehoben und der Überstand für 60 min bei 100.000 g / 4°C zentrifugiert, um Niederschlag P3 zu erhalten. Alle drei Sedimente wurden in je 2 ml hypo-osmotischen Lysispuffer resuspendiert und auf Saccharosegradienten geschichtet.

Der Saccharose-Gradient wurde wie folgt hergestellt: eine 60, 37, 34, 32, 29, 27 und 22 %-ige (w/w) Saccharoselösung wurde mit STED-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 7,6, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 5 µM Leupeptin, 1,54 µM Aprotinin) angesetzt. Beginnend mit der hochprozentigsten Lösung wurde vorsichtig ein Gradient in SW-28-Zentrifugenröhrchen geschichtet (3 ml 60 %; 2 ml 37 %; 3 ml 34 %; 4 ml 32 %; 4 ml 29 %; 3 ml 27 %; 2 ml 22 %). Nach dem Aufbringen der Proben wurde vorsichtig mit hypo-osmotischen Lysispuffer überschichtet, um die Röhrchen aufzufüllen. Die Gradienten wurden für 18 h bei 140.000 g und 4°C zentrifugiert, um die Membranbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufzutrennen (SW-28 Rotor, Beckman).

Nach der differentiellen Zentrifugation wurde der hypo-osmotische Puffer vorsichtig entfernt und vom Saccharose-Gradienten 16 Fraktionen zu je 1,5 ml abgenommen. Die Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure gefällt und in je 100 µl HU-Puffer wieder aufgenommen (Protein-Fällung und HU-Puffer siehe 2.2.2.5). Jeweils 10 µl pro Fraktion wurden für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen verschiedene, organell-spezifische Markerproteine verwendet.

2.2.11 Bioinformatik und Statistik

Die Auswertung der Cs- und Sr-Anreicherung unter Standard- und verschiedenen pH-Bedingungen wurde mit Hilfe der Software *Cluster 3* durchgeführt (Eisen et al. 1998). Einzelne, funktionelle Gruppen wurden durch *k-mean-Clustering* ermittelt (Einstellungen: *Euclidean distance*, 100.000 Durchläufe). Die Auswertung der Cluster erfolgte mit dem Programm *Java TreeView*. Die Interaktionsnetzwerke wurden mit *Cytoscape 2.6* generiert.

Die Auswertung der Kandidatenproteine hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion wurde mit dem *GO Slim Mapper* der SGD-Datenbank durchgeführt. Weiterführende Charakterisierungen wurden mit den Programmen *FunSpec* (<http://funspec.med.utoronto.ca/>) und *CateGORizer* (<http://www.animalgenome.org/bioinfo/tools/countgo/>) durchgeführt. Zur allgemeinen Identifizierung von homologen Proteinen wurde das *PSI-Blast*-Modul der SGD-Datenbank und SIMAP verwendet. Detailliertere Untersuchungen wurden mit *protein blast* von NCBI oder dem Programm *Jalview* (Clamp et al. 2004) durchgeführt.

Statistische Analysen wurden mit dem Programm STATISTICA 7.1 (Statsoft 2005, Tulsa, USA) durchgeführt. Kurvenanpassungen erfolgten mit Hilfe von SigmaPlot (Systat Software 2006, San Jose, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Toxizität von Cs und Sr in *S. cerevisiae*

Cs und Sr sind für die Hefe keine essentiellen Elemente, sie werden aber dennoch in die Zellen aufgenommen. Dies geschieht höchstwahrscheinlich aufgrund der chemischen und physikalischen Ähnlichkeit von Cs zu Kalium (K) bzw. Sr zu Calcium (Ca). Dabei kann es auch zur Beeinträchtigung zellulärer Funktionen kommen, wenn die essentiellen Elemente K und Ca durch ihre Analoga Cs und Sr substituiert werden. Das Interesse dieser Arbeit war es jedoch, Genprodukte zu identifizieren, die unter physiologischen Bedingungen an der Aufnahme der beiden Ionen in die Hefezelle beteiligt sind. Daher sollten Stress-Situation durch toxische oder osmotische Effekte ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt die Toxizitätsgrenzen für Cs und Sr für den Wildtypstamm (BY4741) ermittelt.

In Abbildung 3.1 sind zwei Tropftests dargestellt, die das Hefewachstums bei verschiedenen Konzentrationen dokumentieren. Für Cs lässt sich ableiten, dass Konzentrationen über 50 mM eine wachstumshemmende Wirkung haben. Auf YPD-Medium mit 100 mM CsCl ist das Wachstum bereits stark eingeschränkt. Bei Sr hingegen konnten erst bei relativ hohen Konzentrationen (ab 500 mM) Auswirkungen auf das Wachstum beobachtet werden. Vergleicht man die toxische Wirkung beider Elemente, so haben 500 mM SrCl_2 und 75 mM CsCl eine vergleichbare wachstumshemmende Wirkung. Somit zeigen Hefezellen eine höhere Toleranz für Sr als für Cs.

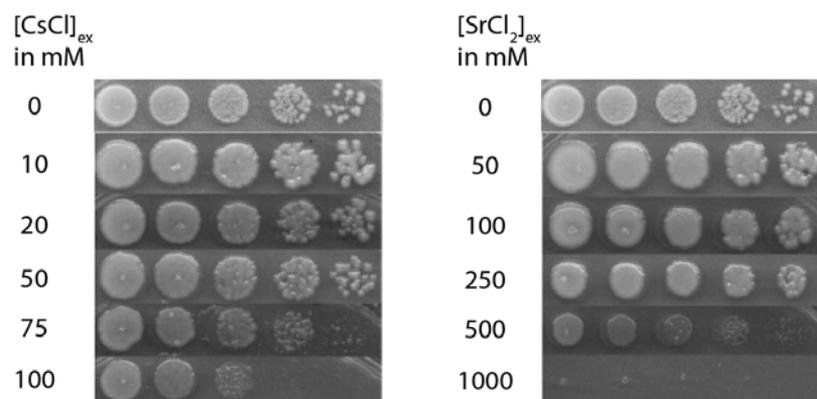


Abbildung 3.1

Toxizitätstest für CsCl und SrCl₂

Die Hefezellen wurden bis zur mittel-logarithmischen Phase bei 30 °C in YPD herangezogen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der Zellsuspension auf YPD-Agar mit den angegebenen CsCl- oder SrCl₂-Konzentrationen aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nach 48 h. Hefezellen zeigen ab 75 mM CsCl ein eingeschränktes Wachstum, im Falle von SrCl₂ hingegen erst ab 500 mM.

In den folgenden Aufnahme-Versuchen (mit Ausnahme der Kinetikexperimente) wurde nur mit Konzentrationen gearbeitet, die deutlich unter den toxischen Grenzwerten für Cs und Sr liegen – in der Regel mit 0,05 mM.

3.2 Untersuchung der Cs- und Sr-Aufnahme in Hefestamm BY4741

Ziel der Untersuchungen war die Identifizierung von Mutanten, die Veränderungen in der Aufnahme und/oder Anreicherung von Cs- und Sr-Ionen aufweisen. Daher wurde das Aufnahmeverhalten von Hefezellen am Wildtyp BY4741 charakterisiert, aus dem alle später verwendeten Mutantenstämme

generiert worden sind, um einen geeigneten Messzeitpunkt für die Untersuchung der gesamten Kollektion festzulegen.

Für die Aufnahme-Experimente wurden die Hefezellen bis zur spätlogarithmischen Phase (OD~2-3) in Vollmedium (YPD) kultiviert. Anschließend wurde eine festgelegte Zellmenge abgenommen, gewaschen und in Assay-Puffer resuspendiert (unter Standardbedingungen: 50 mM HEPES pH 7 + 2 % Glucose). Nach einer 30-minütigen Regenerationsphase wurden die Aufnahmeversuche durch Zugabe der entsprechenden Salze (CsCl und/oder SrCl₂) und radioaktiven Isotope (¹³⁴Cs und/oder ⁸⁵Sr) gestartet (siehe 2.2.6.1 - 2.2.6.3).

3.2.1 Zeitabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme

Die Kinetikversuche wurden mit Zugabe von CsCl oder SrCl₂ (sowie den korrespondierenden Tracern ¹³⁴Cs, ⁸⁵Sr) gestartet (t=0). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben von der Zellsuspension abgenommen und deren Aktivität bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme wurde für beide Elemente bei verschiedenen Konzentrationen (von 0,05 bis 100 mM, siehe Tabelle 3.1) ermittelt. In Abbildung 3.2 sind exemplarisch Aufnahmekurven für Cs- bzw. Sr-Konzentrationen von 0,05 mM und 5 mM dargestellt.

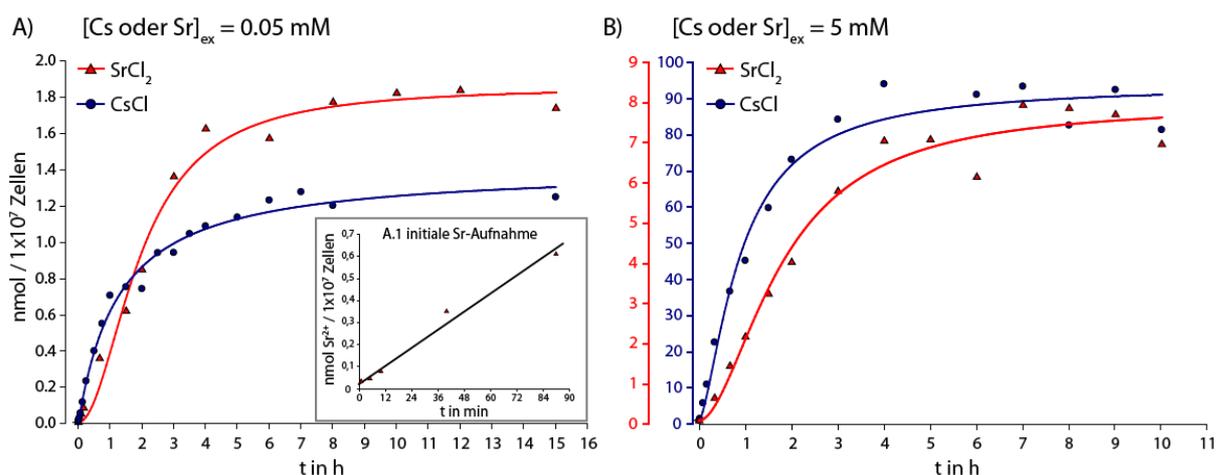


Abbildung 3.2

Zeitabhängigkeit der Cs- und Sr-Anreicherung im Wildtyp BY4741

Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Cs und Sr in Hefezellen bei A) 0,05 mM und B) 5 mM [Cs]_{ex} oder [Sr]_{ex}. Rot dargestellt sind die Werte und Achse für Sr, in Blau für Cs. Beide Aufnahmekurven streben einer Sättigung entgegen. Infolge einer Erhöhung von [Cs]_{ex} oder [Sr]_{ex} steigt auch die maximal aufgenommene Menge an Ionen, wobei bei einer Konzentration von 5 mM wesentlich mehr Cs in die Zelle inkorporiert wird als Sr. A.1) Die initiale Aufnahmekurve von Sr ist linear.

Die zeitliche Abhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme wurde mithilfe der Hillfunktion (1) beschrieben, die einer Michaelis-Menten-Kinetik mit der Erweiterung um den Hillkoeffizient c entspricht.

$$(1) f(x) = \frac{ax^c}{b^c + x^c} \quad \text{Regressionsmethode: 3 Parameter, Hill-Funktion}$$

Der zelluläre Cs-Gehalt steigt in den ersten 60 min steil an und flacht dann langsam ab (Abb. 3.2). Die Sr-Aufnahme verläuft über einen Zeitraum von bis zu 90-120 Minuten linear (siehe 3.2 A.1; diese Phase dauerte länger an, je niedriger die externe Konzentration war), um dann ebenfalls einer

Sättigung entgegen zu steuern (Abb. 3.2). Nach zirka 8 h wird eine Sättigung erreicht, so dass sich der Cs- und Sr-Gehalt der Hefezellen nicht mehr wesentlich veränderte (es wurden Messungen bis zu 15 h durchgeführt).

In der anschließenden, genomweiten Studie wurde auch aus methodischen Gründen der Cs- und Sr-Gehalt nach 12-13 h gemessen. Einflüsse, wie stark unterschiedliche, initiale Aufnahmegeschwindigkeiten konnten auf diese Weise eliminiert werden. Somit war es möglich, die Akkumulation in den Hefezellen zu quantifizieren und zwischen Wildtyp BY4741 und den verschiedenen, isogenen Mutanten zu vergleichen.

Mithilfe des Regressionsmodells konnten die kinetischen Parameter C_{max} und K_d für die zeitabhängige Aufnahme von Cs und Sr berechnet werden. C_{max} ist der maximal erreichbare, intrazelluläre Cs- bzw. Sr-Gehalt. Der K_d -Wert gibt an, in welcher Zeit die Hälfte des maximalen Cs- oder Sr-Gehalt erreicht wurde und kann als Indikator für die Aufnahmegeschwindigkeit gewertet werden. Die Cs-Aufnahme erfolgt bei allen getesteten Konzentrationen schneller als die Sr-Aufnahme, wie den K_d -Werten aus Tabelle 3.1 zu entnehmen ist. Während bei der Sr-Aufnahme für alle gemessenen Konzentrationen der K_d -Wert ungefähr gleich bleibt ($127,3 \pm 12,8$ min), ist er bei der Cs-Aufnahme variabel. Für Cs-Konzentrationen zwischen 0,05 und 10 mM wurde ein K_d -Wert von $41,58 \pm 9,29$ min gemessen, wohingegen er sich bei höheren Konzentrationen (>10 mM bis 100 mM) auf $19,02 \pm 0,85$ min auf etwa die Hälfte verringert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich entweder verschiedene Komponenten an der Cs-Aufnahme beteiligen, die bei unterschiedlichen Cs-Konzentrationen aktiv sind. Oder aber die Aufnahmezeit verändert sich für die beteiligten Transportproteine mit steigenden Cs-Konzentrationen.

A				B			
$[Cs^+]_{ex}$ in mM	C_{max} in nmol Cs/ 1×10^7 Zellen		K_D in min	$[Sr^{2+}]_{ex}$ in mM	C_{max} in nmol Sr/ 1×10^7 Zellen		K_D in min
0,05	1,26	± 0,02	29,28 ± 2,07	0,05	2,08	± 0,12	135,01 ± 15,73
0,5	12,93	± 0,41	38,64 ± 4,22	0,5	3,74	± 0,13	118,23 ± 8,88
1	22,20	± 0,62	39,56 ± 3,78	1	4,04	± 4,04	116,11 ± 9,89
5	92,54	± 3,70	54,23 ± 5,93	5	8,43	± 0,50	120,51 ± 15,25
10	109,89	± 2,87	46,16 ± 3,62	10	10,20	± 0,48	115,71 ± 11,92
20	101,06	± 4,49	19,76 ± 3,78	20	17,89	± 1,94	136,59 ± 32,88
50	101,08	± 2,66	19,20 ± 2,10	50	22,69	± 2,33	151,87 ± 32,50
100	104,70	± 3,33	18,09 ± 2,50	100	23,36	± 2,25	124,31 ± 24,55

Tabelle 3.1

Zeitabhängige Aufnahme von Cs und Sr im Wildtyp BY4741

Zusammenfassung der Parameter der gemessenen Zeitkinetiken bei verschiedenen Konzentrationen A) für Cs und B) für Sr. Aus der oben aufgeführten Formel (1) lässt sich zum einen der maximale Cs- oder Sr-Gehalt der Hefezellen bei einer gegebenen externen Konzentrationen ermitteln, der hier mit C_{max} bezeichnet wird. Zum anderen lässt sich der K_d -Wert bestimmen, der Aufschluss über die Geschwindigkeit der Aufnahme gibt. Für die Berechnungen von K_d und C_{max} wurde der Hillkoeffizient c in Formel (1) gleich 1 gesetzt.

3.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme

Anhand der durchgeführten Zeitkinetiken mit unterschiedlichen Cs- und Sr-Konzentrationen im Assay-Puffer konnte die Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme errechnet werden – messbar an den Parameter V_{max} (maximale Aufnahmegeschwindigkeit oder Aufnahmezeit) und K_m (Substratspezifität, Affinität). Die Aufnahmezeit (v) wird wiedergegeben als Stoffmenge, die von 1×10^7

Zellen pro Minute aufgenommen wird. Diese für unterscheidet sich stark Cs und Sr, für Cs ist sie deutlich höher als die für Sr. Bei einer externen Konzentration von 100 mM werden bis zu 5,4 nmol Cs⁺ aber lediglich 0,18 nmol Sr²⁺ von 1x10⁷ Zellen in einer Minute inkorporiert (siehe Abbildung 3.3). Nach heutigem Stand der Forschung wird angenommen, dass Cs über gleiche Wege wie K aufgenommen wird und Sr über Ca-abhängige Transportwege in die Zelle gelangt. Da Kalium in weit größeren Mengen von der Hefezelle benötigt wird als Ca, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Plasmamembran mehr Kalium-Transporter aufweist. Eine mögliche Erklärung für die hier beschriebenen Ergebnisse zur Cs- und Sr-Aufnahme könnte somit in der Anzahl der Transporter für die jeweiligen Ionen begründet sein. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch für die Aufnahme von Cs mehr und möglicherweise effizientere Transportproteine zur Verfügung stehen als für Sr.

Der ermittelte K_m ist für beide Ionen ähnlich (siehe Abb. 3.3): für Cs konnte ein K_m von ~ 9,5 mM und für Sr von ~ 9,3 mM berechnet werden. Frühere Experimente mit Hefezellen zeigten, dass die Aufnahme von Kalium (K) einen K_m von 0,5 mM aufwies (Armstrong & Rothstein 1964). Hefezellen weisen somit eine eher geringe Affinität für Cs auf. Die Sr-Aufnahme wurde hier mit der Michaelis-Menten-Kinetik (2) beschrieben und der K_m-Wert von 9,3 mM weist auf eine niederaffine Aufnahme hin. Für Sr wurde zusätzlich eine Analyse nach der Methode von Hofstee durchgeführt (Abb 3.3 B.1), die vergleichbare Ergebnisse wie Arbeiten von Borst-Pauwels et al. zeigt. Der konkav geformte Graph des Hofstee-Diagramms lässt sich formal durch die Summe zweier Michaelis-Menten-Gleichungen beschreiben, was auf eine nieder- und eine hochaffine Sr-Transportkomponente hinweist in Analogie zum Ca (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984).

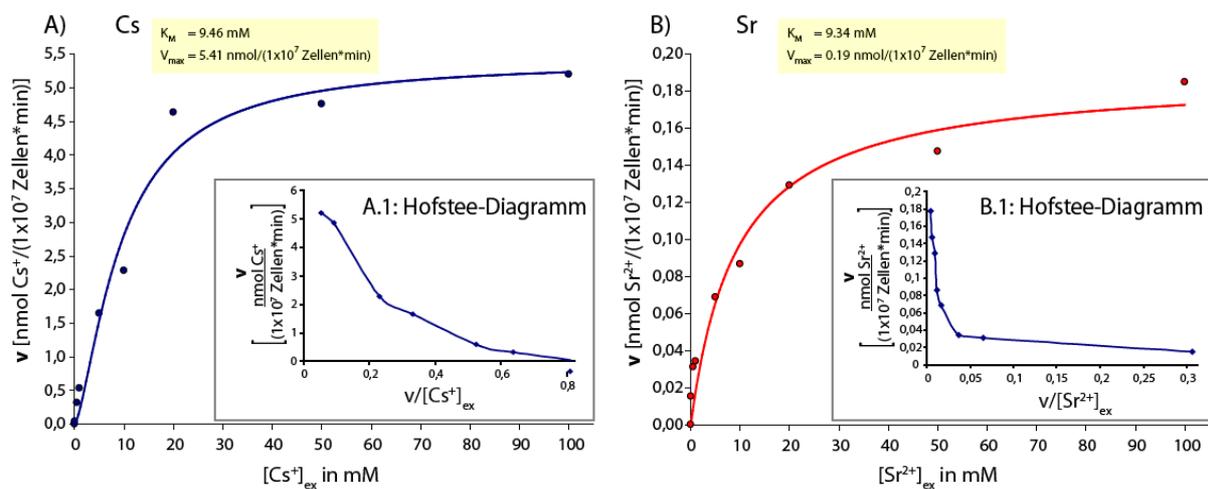


Abbildung 3.3

Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme

Die Kurvenanpassung wurde für die Cs-Aufnahme (A) mit der Hillfunktion durchgeführt. Die Parameter V_{max} und K_m wurden berechnet, indem der Hillkoeffizient c = 1 gesetzt wurde. Im Falle der Sr-Aufnahme (B) wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet (siehe (2)). B.1: Die Beschreibung der Sr-Aufnahme ist nur unzureichend mit der Michaelis-Menten-Kinetik möglich. Anhand anderer Methoden, wie der nach Hofstee lassen sich weiterführende Aussagen zur Sr-Aufnahme treffen. In dieser Analyse wird die Aufnahme rate v gegen den Quotienten von v/[Sr²⁺]_{ex} aufgetragen. Der resultierende Graph weist eine konkave Form auf, was bedeutet, dass wahrscheinlich zwei Komponenten mit unterschiedlicher Affinität zur Aufnahme von Sr beitragen (siehe (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984)). Zum Vergleich ist das Hofstee-Diagramm für die Cs-Aufnahme ebenfalls dargestellt.

(2) $f(x) = \frac{ax}{b + x}$ Regressionsmethode: Michaelis-Menten, Hyberbolisch

3.2.3 Cs und Sr werden in Hefezellen angereichert

Mithilfe der gemessenen Aufnahmewerte konnte auf die Anreicherung von Cs und Sr in der Hefe gegenüber dem umgebenden Medium zurück geschlossen werden. Dabei wurden ein Zellvolumen von $58 \mu\text{m}^3$ (fl) pro haploider Hefezelle (Mittelwert aus (Tyson et al. 1979, Jorgensen et al. 2002, Sherman 2002, Tamaki et al. 2005)) und eine homogene, intrazelluläre Ionenverteilung in der Zelle postuliert. Besonders bei geringen Cs- bzw. Sr-Konzentrationen im Puffer konnte eine bis zu 70-fache Anreicherung für Sr bzw. 45-fache für Cs gegenüber dem Puffer gemessen werden. Mit ansteigenden, externen Konzentrationen nimmt die Anreicherung gegenüber dem Medium ab. Im Falle von Cs wird eine maximale intrazelluläre Konzentration von etwa 180 mM erreicht. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei einer so hohen intrazellulären Konzentration der Großteil der Ionen in verschiedenen Kompartimenten, wie beispielsweise der Vakuole, vorliegt und nicht frei im Cytoplasma. Sr wird im Vergleich zu Cs in geringerem Umfang von den Hefezellen akkumuliert. In dieser Untersuchung stieg die intrazelluläre Sr-Konzentration auf maximal 40 mM an, wenn Sr-Konzentrationen von 50 mM im Medium bzw. Assay-Puffer überschritten wurden. Somit erfolgte ab einer bestimmten externen Sr-Konzentration (~ 50 mM) keine weitere Anreicherung mehr in den Hefezellen gegenüber dem Medium bzw. Assay-Puffer.

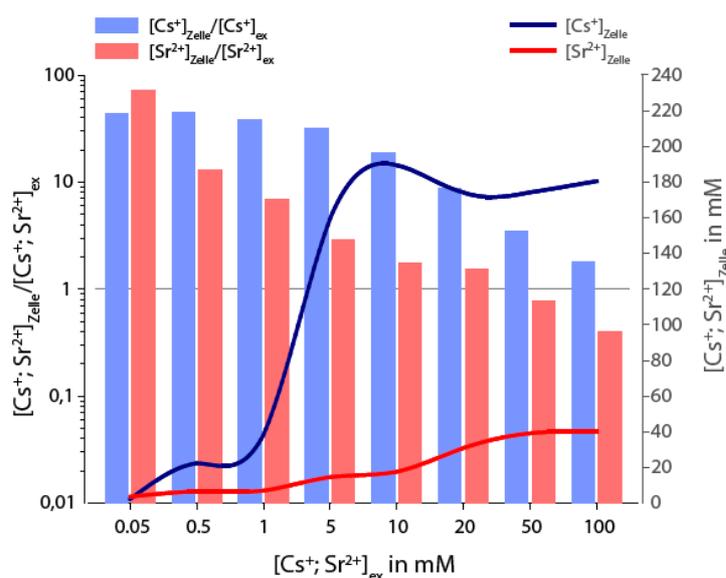


Abbildung 3.4

Anreicherung und absolute zelluläre Cs- und Sr-Konzentration im Wildtyp BY4741

Gegenübergestellt sind hier die Anreicherung von Cs und Sr in den Hefen gegenüber dem Puffer (Medium) und die absolut erreichten intrazellulären Ionenkonzentration. Die Anreicherung ist als Balken-Diagramm dargestellt als Quotient der intrazellulären Konzentration und externe Konzentration. Der Anstieg der intrazellulären Konzentration infolge einer Konzentrationserhöhung der Cs- und Sr-Ionen im Puffer wird durch die beiden Graphen dargestellt. Die Daten für Cs sind stets in blau dargestellt, Werte für Sr werden in rot präsentiert.

3.3 Analyse der Cs- und Sr-Anreicherung in 4862 Mutantenstämmen

Die Untersuchung der Cs- und Sr-Anreicherung wurde mit einer Kollektion von 4862 haploiden Hefemutantenstämmen durchgeführt. Die Studie wurde im 96er-Plattenformat organisiert, wobei jede Platte 94 Mutantenstämmen, einem Wildtyp und eine Leerkontrolle enthielt. In einer ersten Analyse wurden für alle Mutanten zwei Datensätze für die Cs- und Sr-Anreicherung aufgenommen. Für 4563 Mutanten konnte dies erreicht werden und für weitere 161 lag zumindest ein Messwert für Cs und Sr vor (gesamt $n=4724$). Zur Auswertung der Untersuchung wurden die Rohdaten (gemessene ^{134}Cs und ^{85}Sr -Aktivität) anhand der eingesetzten Zellzahl normiert (Angabe in Cs- bzw. Sr-Anreicherung/ 1×10^7 Zellen).

Das Aufnahmeverhalten der Mutanten wurde anhand von Z-Scores (Berechnung siehe (3)) mit einem Referenzwert verglichen. Mithilfe der Z-Scores kann die Verteilung der Rohdaten standardisiert dargestellt werden, wobei die Standardabweichung des Referenzwertes als Einheitsgröße dient. Da in diesem ersten Untersuchungsabschnitt jeweils nur eine Wildtyp-Messung pro 96er-Platte zur Verfügung stand, wurde anstelle des Wildtyps das Plattenmittel als Referenz verwendet, da es robuster und weniger fehleranfällig war (Kompensation von Ausreißern). Das Verhältnis von Wildtyp zu Plattenmittel betrug sowohl für Cs wie auch für Sr $0,95 \pm 0,10$ für 114 durchgeführten Messungen, was eine sehr gute Übereinstimmung beider Referenzwerte darstellt. Die Standardabweichung des Wildtyps BY4741 betrug 14,6 % für die Cs-Anreicherung ($0,85 \pm 0,12 \text{ nmol Cs}^+ / 1 \times 10^7 \text{ Zellen}$) und 14,9 % für die Sr-Anreicherung ($1,36 \pm 0,20 \text{ nmol Sr}^{2+} / 1 \times 10^7 \text{ Zellen}$) ($n=114$).

$$(3) Z - Score = \frac{C_{Mut} - C_{WT}}{\sigma_{WT}}$$

C_{Mut}	Cs oder Sr-Gehalt des Mutantenstammes
C_{WT}	Cs oder Sr-Gehalt des Wildtyps bzw. Plattenmittel
σ_{WT}	Standardabweichung des Wildtyps

Die Auswertung der Daten ergab, dass das Aufnahmeverhalten für Cs wie auch für Sr einer Normalverteilung folgt. Erwartungsgemäß entsprach die Cs- bzw. Sr-Anreicherung für den Großteil der Mutanten dem des Wildtyps und nur ein geringer Anteil bewegt sich in den Extrembereichen. Dies wird in den beiden folgenden Histogrammen (Abb. 3.4 A und B) veranschaulicht. Dargestellt sind die Z-Scores für die Cs- bzw. Sr-Akkumulation aller Mutanten und ihre Verteilung. Der Wildtyp BY4741 (bzw. das Plattenmittel) entspricht einem Z-Score von 0. Alle Mutanten mit geringerer Aufnahme als der Wildtyp weisen einen negativen Z-Score auf und jene mit erhöhter Aufnahme einen positiven. Die Verteilung ist symmetrisch, weist in beiden Fällen aber eine leichte Schiefe auf (0,58 für Cs und 1,50 für Sr). Die Ursache hierfür ist das Vorkommen von proportional mehr Mutanten mit einer erhöhten Cs- bzw. Sr-Anreicherung als mit einer reduzierten. Inwieweit dies durch die Messmethode bzw. Versuchsbedingungen verursacht wurde, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

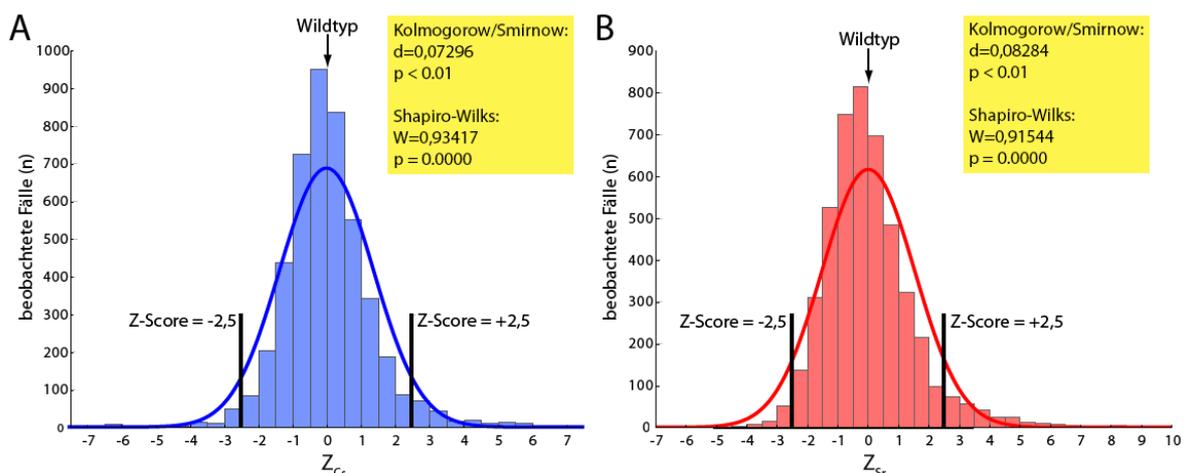


Abbildung 3.5

Verteilung der Mutanten anhand ihres Aufnahmeverhaltens

Die Verteilung der Mutanten hinsichtlich ihres Aufnahmeverhaltens entspricht einer Normalverteilung, was sowohl durch den Shapiro-Wilks-Test als auch den Kolmogorow-Smirnow-Test bestätigt werden konnte. A) Verteilung anhand der Cs-Akkumulation und B) Verteilung der Mutanten bezogen auf die Sr-Anreicherung. Angegeben ist zusätzlich der Grenzwert (Z-Score von $\pm 2,5$, schwarze Balken), der zur Auswahl von Kandidaten mit signifikant veränderter Cs- bzw. Sr-Anreicherung herangezogen wurde.

Zur Auswahl potentieller Kandidaten mit einem abweichenden Aufnahmeverhalten wurde ebenfalls der Z-Score verwendet: Alle Mutanten, die um mindestens 2,5 Standardabweichungen vom Wildtyp bzw. Plattenmittel abweichen ($-2,5 \geq Z\text{-Score} \geq 2,5$), wurden für weitere Analysen ausgewählt. Nach den initialen Messdurchgängen ($n=2$) erfüllten 448 Mutanten diese Bedingung. Um die gemessenen Unterschiede statistisch zu validieren, wurden die ausgewählte Mutanten erneut unter Standardbedingungen getestet ($n=4$). Auf diese Weise konnte für 212 Mutanten ein verändertes Aufnahmeverhalten für Cs und/oder Sr bestätigt werden. Im Rahmen der genomweiten Analyse konnten somit 4 % der untersuchten Mutanten mit einem veränderten Aufnahmeverhalten assoziiert werden. Dabei unterschied sich die Aufnahmekapazität der einzelnen Mutantenstämme für Cs um den Faktor 125 und für Sr um den Faktor 15. Weitere drei Prozent der Kollektion konnten nicht evaluiert werden, da die Deletionen zu gravierenden Beeinträchtigungen des Wachstums führten. Die restlichen 93 % der Mutantenstämme zeigten ein vergleichbares Aufnahme- bzw. Anreicherungsverhalten für Cs und Sr wie der Wildtyp-Stamm BY4741 (siehe Abbildung 3.6).

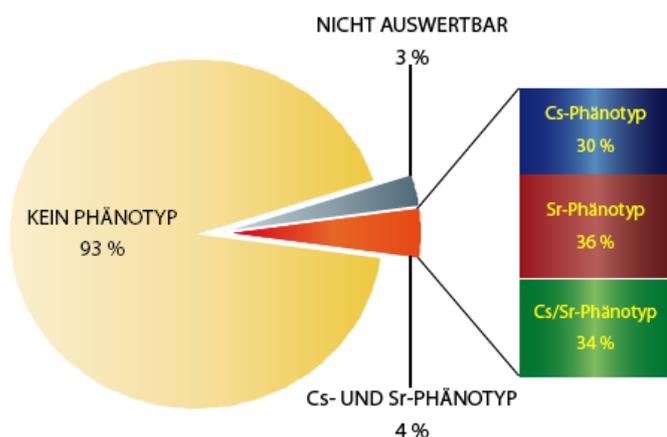


Abbildung 3.6

Überblick über die gesamte untersuchte Hefemutanten-Kollektion

Zusammenfassung des genomweiten Aufnahme-Assays für Cs und Sr. Anhand des Kreisdiagramms wird noch einmal veranschaulicht, dass 93% der untersuchten Mutanten keinen Phänotyp für die Cs oder Sr-Aufnahme aufwiesen. 3 % der Kollektion konnten nicht ausgewertet werden, da das Wachstum dieser Mutanten stark beeinträchtigt war. Die restlichen 4 % der Mutanten weisen ein verändertes Aufnahmeverhalten für Cs und/oder Sr auf. Im Balkendiagramm wird die Verteilung auf die drei möglichen Phänotypen dargestellt.

Ein Überblick darüber, für welche der beiden Elemente die 212 identifizierten Mutanten veränderte Aufnahmeeigenschaften hatten, ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Betrachtet man nur die Kandidaten mit verändertem Aufnahme- bzw. Anreicherungsverhalten für eines der beiden Ionen, so konnten mehr Mutanten mit einem Sr-Phänotyp ($n=76$) identifiziert werden als mit einem Cs-Phänotyp ($n=64$).

	Verminderte Cs-Aufnahme	Erhöhte Cs-Aufnahme	Verminderte Sr-Aufnahme	Erhöhte Sr-Aufnahme
Verminderte Cs-Aufnahme	33			
Erhöhte Cs-Aufnahme		31		
Verminderte Sr-Aufnahme	0	1	7	
Erhöhte Sr-Aufnahme	24	47		69

Tabelle 3.2

Aufteilung der identifizierten Mutanten in verschiedene Kategorien

Zusammenstellung der Mutanten nach ihren Phänotyp. Mutanten mit Cs-Phänotyp sind blau, mit Sr-Phänotyp rot und mit Cs/Sr-Phänotyp grün unterlegt.

3.4 Der Einfluss des pH-Milieus auf die Cs- und Sr-Anreicherung

Neben der extrazellulären Konzentration hängt die Ionenaufnahme in die Zelle auch vom pH-Wert des umgebenden Mediums ab. Der pH-Wert bestimmt maßgeblich, ob die Ionen frei (d.h. in hydratisierter Form) oder gebunden vorliegen und somit für die Aufnahme nicht zugänglich sind. *Saccharomyces cerevisiae* bevorzugt ein leicht saures Wachstums-Milieu und ist in der Lage, das umgebende Medium anzusäuern.

Die Cs- und Sr-Anreicherung wurde bei den vorangegangenen Untersuchungen in 50 mM HEPES-Puffer bei pH 7 gemessen. Im Laufe der Aufnahmephase säuerten die Hefen den Puffer jedoch bis auf pH 5 an. Daher wurde in einem weiteren Experiment getestet, in wieweit die Cs- und Sr-Anreicherung von den pH-Bedingungen beeinflusst wird. Hierfür wurden verschiedene Puffersysteme ausgewählt, die einen konstanten pH-Wert über die gesamte Aufnahmephase gewährleisteten (200 mM MES pH 5 und 6, 400 mM HEPES pH 7). Aufnahmeversuche bei alkalischen pH-Bedingungen (pH 8) wurden ebenfalls durchgeführt. Da die Hefezellen aber unter diesen Bedingungen zu stark gestresst waren, wurden diese Messungen von der Auswertung ausgeschlossen.

Für den Wildtyp zeichnete sich folgendes, pH-abhängiges Aufnahmeverhalten ab:

Die Cs-Anreicherung unterschied sich bei pH 5 und 6 nicht deutlich und betrug etwa 0,6-0,7 nmol Cs⁺/1x10⁷ Zellen. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 7 stieg die Cs-Aufnahme um mehr als das Doppelte auf 1,58 nmol Cs⁺/1x10⁷ Zellen an (siehe Abb. 3.7). Die Anreicherung von Cs in den Hefezellen ist unter Standard-Bedingungen nur geringfügig größer als bei konstantem pH 5 oder 6. Unter diesen Versuchsbedingungen kommt es, wie oben beschrieben, zu einer Ansäuerung des Mediums bis auf ca. pH 5 und somit herrschen ähnliche Bedingungen für die Aufnahme wie bei konstantem pH 5 oder 6.

Die Aufnahme von Sr zeigt weniger Unterschiede zwischen den verschiedenen pH-Milieus. Bei neutralem pH wurden geringfügig weniger Sr-Ionen aufgenommen als bei pH 5 oder 6, der Unterschied betrug maximal Faktor 1,5 (zwischen pH 6 und pH 7). Die stärkste Sr-Anreicherung erfolgte unter Standardbedingungen (ca. 1,2 nmolSr²⁺/1x10⁷ Zellen). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Cs-Aufnahme wesentlich stärker abhängig ist vom pH-Wert des Mediums als für Sr. Es ist möglich, dass Cs vermehrt über Transportwege in die Zelle gelangt, die von einem elektrochemischen Gradienten abhängig sind (Transporter), während Sr möglicherweise eher über einfache Diffusion (Kanäle) oder mithilfe von ATPasen in die Zelle gelangt.

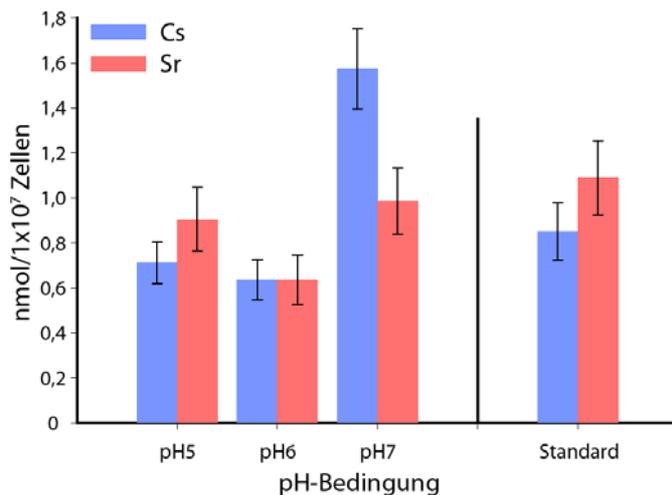


Abbildung 3.7

Cs- und Sr-Anreicherung bei verschiedenen pH-Bedingungen

Dargestellt sind die Ionengehalte an Cs (blau) und Sr (rot) im Wildtyp BY4741 unter den folgenden pH-Bedingungen:

1. pH5 (200 mM MES pH 5 + 2 % Glucose)
2. pH6 (200 mM MES pH 6 + 2 % Glucose)
3. pH7 (400 mM HEPES pH 7 + 2 % Glucose)
4. Standard (50 mM HEPES pH 7 + 2 % Glucose)

Während bei Bedingung 1.-3. der pH-Wert konstant gehalten wurde, veränderte er sich unter den Standardbedingungen (zu pH 5) über die 13 h Messzeit.

Neben dem des Wildtyps wurde das Aufnahmeverhalten von insgesamt 187 Mutanten bei verschiedenen pH-Bedingungen untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob die zuvor ermittelten Phänotypen stabil waren oder sich pH-abhängig veränderten. Für jeden pH-Bedingung wurden 2 Messungen durchgeführt und die entsprechenden Z-Scores für die Cs- und Sr-Aufnahme berechnet (Referenz: Wildtypstamm). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 zusammengefasst: Es konnte festgestellt werden, dass die zuvor beobachteten Phänotypen unter den getesteten pH-Bedingungen weitestgehend stabil waren. Generell zeigten Mutanten mit erhöhter Cs- und/oder Sr-Anreicherung stärkere pH-abhängige Schwankungen als Mutanten mit verminderter Akkumulation.

Entgegen dem allgemeinen Trend konnten jedoch auch einige Mutanten identifiziert werden, deren Phänotyp sich mit steigendem pH veränderte. So zeigt beispielsweise eine Gruppe von Mutantenstämmen (*snf7Δ*, *stp22Δ*, *vps20Δ*, *vps28Δ*, *vps36Δ*), die bei pH 5 eine erhöhte Aufnahme für Sr vorweist, bei pH 7 hingegen eine normale bis verminderte Aufnahme. Alle fünf Kandidaten gehören zu *vps*-Mutanten der Klasse E (*vps* = „*vacuolar protein sorting*“). Diese Klasse von Mutanten zeigen Defekte in der Proteinsortierung vom Golgi-Apparat zur Vakuole. Infolge der Fehlfunktion sammeln sich zu transportierende Proteine im prävakuolären Kompartiment – dem sogenannten E-Kompartiment – an, was dadurch stark vergrößert wird (siehe auch Abschnitt 3.7.1).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die unter Standardbedingungen ermittelten Phänotypen mit Ausnahme einiger weniger Kandidaten wie z. B. den erwähnten *vps*-Mutanten weitestgehend stabil waren.



Abbildung 3.8
pH-Abhängigkeit der Cs- und Sr-Anreicherung der Kandidaten

Aufgetragen sind die Z-Scores für Cs und/oder Sr. Negative Z-Scores (verminderte Aufnahme) sind in grün dargestellt, positive Z-Scores (erhöhte Aufnahme) in rot. Jeweils in der ersten Spalte ist die Aufnahme unter Standardbedingungen aufgetragen (Std). Als Vergleich ist das Aufnahmeverhalten bei pH 5, 6 und 7 dargestellt (5, 6, 7). In Grau sind fehlende Werte angegeben.

Eine Gruppe von vps-CAC2 Mutanten zeigte eine pH-abhängige Veränderung in der Sr-Akkumulation (gelb unterlegt).

Neben dieser Gruppe gibt es ein paar wenige Ausreißer, die einen gänzlich anderen Phänotyp unter veränderten pH-Bedingungen zeigten (GPH1, VRP1).

3.5 Vergleichende Analyse zwischen Cs, Sr und den essentiellen Elementen K und Ca

Die nächste interessante Frage, die sich stellte, bezog sich darauf, ob und inwieweit die Anreicherung der essentiellen Elemente K und Ca in den Kandidaten-Stämmen ebenfalls gestört ist. Dazu wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt, die die K- und Ca-Homöostase beleuchten sollten:

i) Zum einen sollte die Anreicherung von Ca und K unter den vorher verwendeten Assay-Bedingungen getestet werden. Die Ca-Anreicherung lies sich durch die Verwendung von ^{45}Ca als Tracer gut untersuchen. Die Analyse der K-Anreicherung gestaltete sich schwieriger, da keine geeigneten Radioisotope erhältlich sind. Deshalb wurden die Aufnahme-Experimente anstelle von K mit Rubidium (Rb) durchgeführt und ^{86}Rb als Tracer genutzt. Rb wird vielfach für Untersuchungen der K-Aufnahme herangezogen, da es eine sehr große Ähnlichkeit zum K aufweist, die viel stärker ausgeprägt ist als zwischen K und Cs (Rodriguez-Navarro 2000, Prista et al. 2007). Die Aufnahme-Untersuchungen erfolgten unter Standard-Bedingungen (50 mM HEPES pH7 + 2 % Glucose, 0,05 mM des betreffenden Ions). Es wurden sowohl Messungen durchgeführt, in denen nur Rb oder Ca eingesetzt wurden und auch Versuche mit den Kombinationen Cs/Rb und Ca/Sr, um die Aufnahme und Anreicherung der essentiellen Elemente (Ca, K) mit denen der nichtessentiellen Elemente Cs und Sr zu vergleichen. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.3 für Cs und Sr beschrieben über Z-Scores.

ii) Weiterhin wurde eine Analyse des K- und Ca-Gehalts mit Hefezellen durchgeführt, die in Vollmedium (ohne Cs oder Sr-Zusätze) kultiviert wurden. Hierfür wurde für den Wildtyp und 120 ausgewählte Hefemutanten der zelluläre K- und Ca-Gehalt mittels ICP-OES ermittelt („*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*“). Dabei handelt es sich um eine optische Emissionsspektrometrie, die zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Elementen in der analytischen Chemie verwendet wird und sehr sensitiv ist.

Die Hefezellen wurden für diese Untersuchung für 20 h in Vollmedium (YPD) kultiviert (YPD enthält laut ICP-OES-Messung: $11,00 \pm 0,56$ mM K sowie $0,30 \pm 0,08$ mM Ca). Für den Wildtyp konnten $79 \pm 3,4$ μmol K und $0,40 \pm 0,02$ μmol Ca pro 1×10^7 Zellen gemessen werden. Bei der Annahme einer homogenen Ionenverteilung in der Zelle entspräche dies einer intrazellulären Konzentration von zirka 134 mM K und 0,64 mM Ca (unter Berücksichtigung eines Zellvolumens von 58 fl, siehe 3.2.3). K wird um mehr als das 10-fache gegenüber dem Medium angereichert und Ca um ungefähr das 2 bis 3-fache. Die Auswertung der Mutanten erfolgte durch den Vergleich mit den beschriebenen Wildtyp-Daten. Da für den Wildtyp nur eine geringe Standardabweichung von ca. 3,5 % gemessen wurde, erfolgte die Klassifizierung der Mutanten hinsichtlich eines veränderten K-/Ca-Gehalt erst ab einem Z-Score von 4 ($-4 > \text{Z-Score} > 4$), was einer Veränderung von ungefähr 15 % gegenüber des Wildtyp entspricht. Von den 120 untersuchten Mutanten (Kandidaten mit Defekten in der Translation und Transkription wurden nicht eingeschlossen) zeigten insgesamt 65 Veränderungen im zellulären K- und/oder Ca-Gehalt, wobei von diesen 58 für Ca und 23 für K Abweichungen zeigten.

3.5.1 Die Rb- und Cs-Anreicherung unterscheidet sich bei den Kandidaten

Für den Wildtyp konnte bei externen Konzentrationen von 0,05 mM eine Rb-Anreicherung von 0,89 nmolRb⁺/1x10⁷ Zellen ermittelt werden. Dies ist in etwa vergleichbar mit der Cs-Akkumulation von 0,84 nmolCs⁺/1x10⁷ Zellen. Bei Experimenten, in denen sowohl Cs als auch Rb im Puffer enthalten waren, wurden aus messtechnischen Gründen mit einer Konzentration von 0,1 mM gearbeitet. Unter diesen Bedingungen wurde von den Hefen für beide Ionen jeweils 0,52 nmol/1x10⁷ Zellen angereichert. Zusätzlich zum Wildtyp wurden 153 Mutanten hinsichtlich ihrer Rb-Aufnahmeeigenschaften untersucht, von denen 90 Abweichungen in der Cs-Anreicherung zeigten. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Rb-Aufnahme (im Vergleich zum Wildtyp) zwischen Messungen mit und ohne Cs-Zugabe gefunden werden.

Die Aufnahme der Mutanten wurde anhand von Z-Scores evaluiert und statistisch ausgewertet. Generell ist festzustellen, dass die Rb-Anreicherung innerhalb der getesteten Mutantenstämme weniger variiert als dies für Cs der Fall ist (Varianz für Cs beträgt 14,1, für Rb lediglich 1,95).

Tendenziell zeigen die Mutantenstämme ein ähnliches Aufnahme- und Anreicherungsverhalten für Cs und Rb. Qualitativ ist jedoch ein Unterschied ermittelbar. 90 % aller Mutanten mit Cs-Phänotyp zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen der Anreicherung von Rb und Cs, der mindestens Faktor 1,3 beträgt. In der Regel ähnelt dabei die Akkumulation von Rb mehr dem Wildtyp-Verhalten als dies für Cs der Fall war.

In Abbildung 3.9 A wurden die Z-Scores für Cs- und Rb-Anreicherung gegeneinander aufgetragen, um einen Zusammenhang (Korrelation) in der Aufnahme beider Ionen besser zu illustrieren. Als Maß für die Korrelation wird r , der Korrelationskoeffizient, herangezogen. Zwischen der Akkumulation von Cs und Rb beträgt $r = 0,65$ und impliziert somit eine moderat ausgeprägte, positive Korrelation für alle 153 untersuchten Mutanten. Stellt man die Rb- und Cs-Anreicherung von Mutanten mit verminderter bzw. erhöhter Cs-Anreicherung einzeln gegenüber, so ergibt sich in beiden Fällen eine schwächere Korrelation zur Rb-Akkumulation: Mutanten mit verminderter Aufnahme weisen einen $r = 0,49$ auf und Mutanten mit erhöhter Aufnahme lediglich $r = 0,05$. Zwischen der Akkumulation von Cs und Rb besteht also für eine bestimmte Gruppe von Mutanten ein deutlicher Unterschied.

Betrachtet man diese Mutanten genauer, so zeigen 36 von ihnen im Gegensatz zu ihrer deutlich veränderten Cs-Anreicherung bei der Rb-Akkumulation lediglich eine Abweichung von maximal 1 Standardabweichung ($-1 \geq \text{Z-Score} \geq 1$) vom Wildtyp (siehe Abb. 3.9 B). Diese Mutanten deuten darauf hin, dass sie spezifisch in ihrer Cs-Anreicherung verändert sind, aber nicht in der Rb- und im weitesten Sinne K-Akkumulation. Demnach scheint die Cs-Anreicherung nicht ausschließlich über K-Transportwege vermittelt zu werden oder teilweise einer anderen Regulation zu unterliegen. Unter diese Kandidaten sind auch Gene verschiedener Transportproteine wie KHA1, FCY2, FPS1, TRK1 sowie für regulatorische Proteine wie NPR1 und YPK1 zu finden (nähere Details zur Funktion siehe Tabelle 3.4).

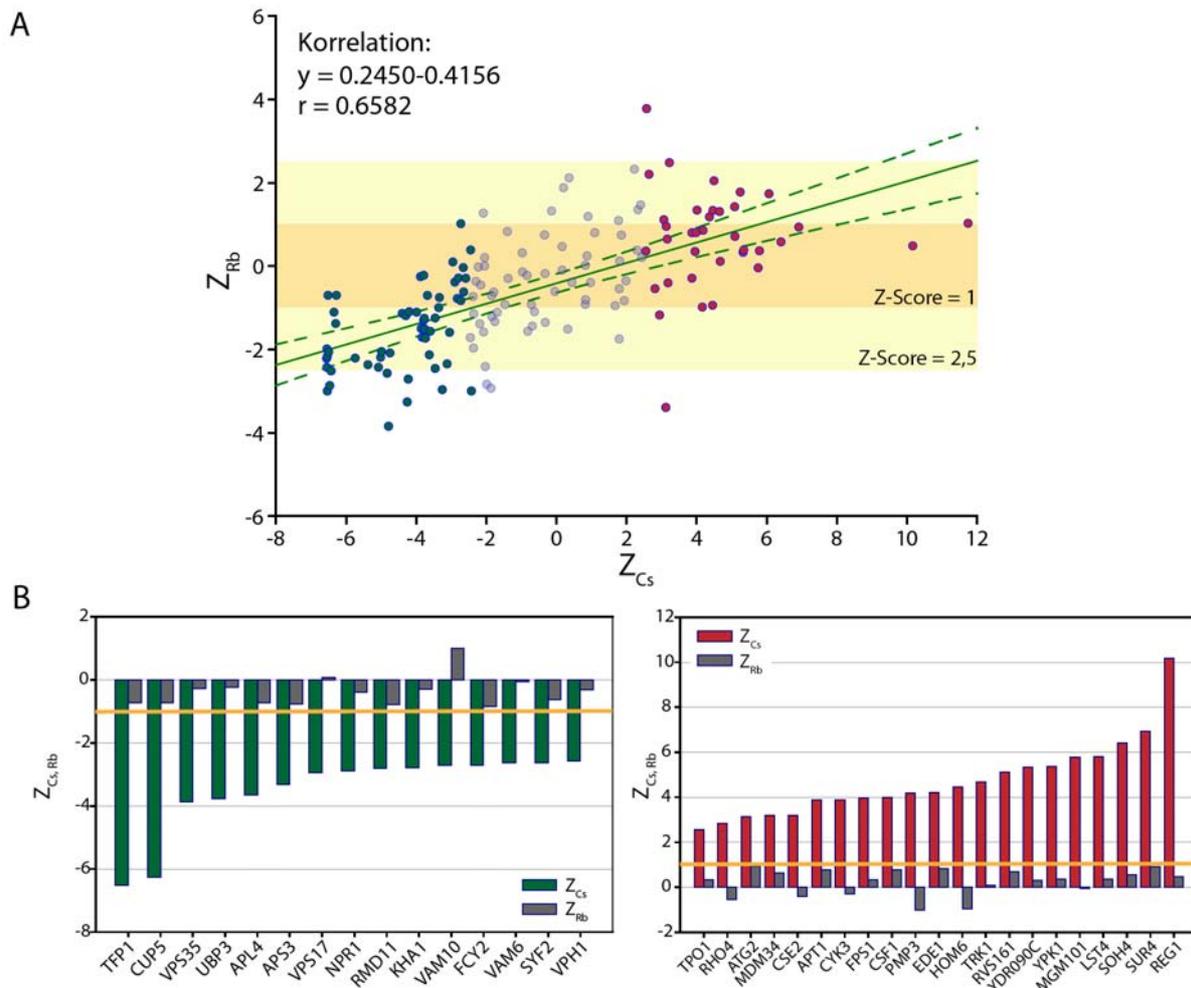


Abbildung 3.9

Rb- und Cs-Anreicherung im Vergleich

A) Aufgetragen wurde der Z-Score für die Rb-Anreicherung gegen den der Cs-Akkumulation aller 153 Mutantenstämme (auch der Mutanten mit Sr-Phänotyp). Mutanten mit verminderter Cs-Anreicherung sind mit grüne Punkten und die mit erhöhter Anreicherung mit roten Punkten dargestellt. Gelb unterlegt wurde zum einen der Bereich der Rb-Anreicherung, der dem Auswahlkriterium $Z\text{-Score} = |2,5|$ entspricht. Alle Datenpunkte außerhalb dieses Bereichs weisen auf einen Rb-Phänotyp der Mutanten hin. Weiterhin wurde eine engere Grenze von $Z\text{-Score} = |1|$ gesetzt, um zu verdeutlichen, dass ein Teil der Mutanten keinerlei Auffälligkeiten in der Rb-Akkumulation aufweist, während die Abweichungen in der Cs-Anreicherung beträchtlich sind. B) Dargestellt sind alle Mutanten, die einen Cs-Phänotyp aufweisen, aber keine Auffälligkeiten in der Rb-Akkumulation (Abweichungen ≤ 1 Standardabweichung, gelbe Linie).

3.5.2 Mutanten mit Cs-Phänotyp zeigen Veränderungen im zellulären Ca- aber nicht K-Gehalt

Betrachtet man alle Mutanten, die ein verändertes Cs-Anreicherungsverhalten aufwiesen (n=76), so zeigte knapp die Hälfte von ihnen (45 %, n=34) keine Veränderungen in ihrem intrazellulären K- und Ca-Gehalt. 32 % dieser Kandidaten (n=24) wiesen einen gestörten Ca-Haushalt auf und lediglich 5 % (n=4) waren allein in ihrer K-Homöostase gestört. Die restlichen 14 Kandidaten (18%) zeigten sowohl für K als auch für Ca Abweichungen.

Anhand der gewonnenen Daten lässt sich kein starker Zusammenhang zwischen dem zellulären K-Gehalt und der Cs-Anreicherung der Hefezellen herstellen, da knapp 80 % der Mutanten keinerlei Veränderungen im K-Haushalt zeigten. Bei der Mehrzahl der Kandidaten mit einem veränderten K-Level lag eine negative Korrelation zwischen K-Gehalt und Cs-Akkumulation vor. So ließ sich in den

meisten Fällen eine verminderte Cs-Aufnahme mit einem erhöhten K-Gehalt der Zelle assoziieren. In diese Kategorie fallen vor allem V-ATPase-Mutanten. Bei diesen Mutanten ist die Funktion der Vakuole stark beeinträchtigt, woraus eine massive Störung der intrazellulären Ionenhomöostase resultiert (Nelson 2003). Ob der erhöhte K-Gehalt bei diesem Kandidaten somit wirklich einen Hinweis auf eine selektivere Aufnahme von K gegenüber Cs darstellt, bleibt offen.

Im Gegensatz dazu zeigt knapp die Hälfte der hier beschriebenen Mutanten mit Cs-Phänotyp gleichzeitig einen gestörten Ca-Haushalt (n=38). Bei ca. 63 % dieser Mutanten besteht eine positive Korrelation zwischen der Cs-Anreicherung und dem intrazellulären Ca-Gehalt. Eine Wechselbeziehung zwischen Ca und Cs scheint daher viel ausgeprägter zu sein als zwischen K und Cs. Ca dient in der Zelle in erster Linie als Signalmolekül. Denkbar wäre daher, dass die Cs-Aufnahme bzw. -Abgabe teilweise Ca-sensitiven bzw. Ca-regulierten Mechanismen unterliegt.

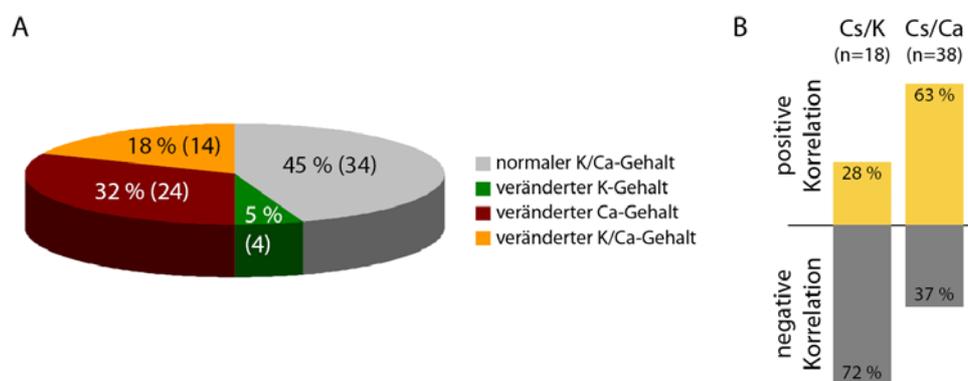


Abbildung 3.10

K- und Ca-Gehalt von Mutanten mit einer gestörten Cs-Akkumulation

A) Aufteilung aller Mutanten mit Cs-Phänotyp hinsichtlich ihres K- und Ca-Gehalts. Ungefähr die Hälfte der Mutanten zeigte keine großen Veränderungen in ihrem Ca und K-Gehalt (Veränderung < 15 %, grau), während weiteres Drittel Abweichungen in ihrem Ca-Level aufwiesen (rot). Die Zahlen in der Klammer sind die Absolutwerte (Anzahl der Mutanten in der Kategorie). **B)** Repräsentation der Korrelation zwischen Cs-Anreicherung unter Assay-Bedingungen und dem K- oder Ca-Gehalt der Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen.

Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass zwischen Cs und K deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Anreicherung in den Hefezellen bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass i) die Rb-Anreicherung, die hier als Ersatz für die Akkumulation von K in der Hefe untersucht wurde, für eine größere Gruppe von Kandidatenstämmen signifikante Unterschiede zu Cs bestanden. Gleichzeitig konnte bei den meisten untersuchten Stämmen kein Zusammenhang mit Veränderungen in der K-Homöostase von Hefezellen hergestellt werden, die in YPD-Medium kultiviert wurden. Demnach scheint es einige Proteine zu geben, die eine spezifische Wirkung auf die Akkumulation von Cs in *S. cerevisiae* haben. Hervorzuheben sind die Gene FCY2, APL4, FPS1, YDR090C, EDE1 und ATG2, da die zugehörigen Mutanten ausschließlich für Cs Auffälligkeiten zeigen. In Tabelle 3.3 sind alle 36 Mutantenstämmen nochmals zusammengefasst.

Gen	ORF	Anreicherung					zell. Gehalt	
		Z _{Cs}	Z _{Rb}	Z _{Sr}	Z _{Sr} (Ca)	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}
FCY2	YER056C	-2.71	-0.85	-1.39	0.66	0.86	-3.10	1.88
RMD11	YHL023C	-2.81	-0.80	5.35	2.32	4.03	-0.37	-1.56
APS3	YJL024C	-3.32	-0.77	-0.77	-3.10	-3.68	1.74	-0.31
TFP1	YDL185W	-6.51	-0.72	2.36	-0.46	-0.54	-4.13	1.13
CUP5	YEL027W	-6.27	-0.72	0.32	-1.83	-3.11		
APL4	YPR029C	-3.66	-0.72	2.36	1.60	1.75	0.42	1.45
SYF2	YGR129W	-2.63	-0.64	1.49	1.20	2.29		
NPR1	YNL183C	-2.88	-0.40	0.75	1.72	2.82	2.66	2.45
VPH1	YOR270C	-2.57	-0.31	4.22	-0.29	-0.31	2.39	-8.12
KHA1	YJL094C	-2.78	-0.31	1.31	2.09	0.97	-0.25	5.20
VPS35	YJL154C	-3.86	-0.27	-0.63	-1.30	-2.72	-1.21	-2.45
UBP3	YER151C	-3.77	-0.24	2.15	0.89	0.37	8.09	6.80
VAM6	YDL077C	-2.64	-0.06	14.45	5.49	7.73	0.02	1.77
VPS17	YOR132W	-2.94	0.08	3.03	0.82	-0.84	0.54	7.80
VAM10	YOR068C	-2.71	1.00	-0.55	-3.02	-4.36	2.96	5.72
PMP3	YDR276C	4.18	-1.00	7.08	1.91	1.66	-0.25	13.38
HOM6	YJR139C	4.47	-0.96	8.63	1.34	0.93		
RHO4	YKR055W	2.83	-0.56	9.48	4.04	3.86	7.36	14.12
CSE2	YNR010W	3.20	-0.42	5.96	4.37	3.99		
CYK3	YDL117W	3.88	-0.31	1.10	-2.00	-2.68	3.98	5.24
MGM101	YJR144W	5.77	-0.06	7.60	1.84	0.43	-3.13	7.89
TRK1	YJL129C	4.69	0.09	14.89	3.12	2.85	-2.72	3.10
YPK1	YKL126W	5.34	0.31	2.01	-1.12	-1.76	6.04	16.55
FPS1	YLL043W	3.97	0.33	-0.11	-1.01	-1.02	0.05	1.25
TPO1	YLL028W	2.57	0.34	-2.59	-0.84	-1.32	-1.17	5.95
LST4	YKL176C	5.81	0.35	-0.40	-2.27	-2.70	2.82	1.67
YDR090C	YDR090C	5.36	0.37	-0.58	-0.13	-0.04	1.61	3.68
REG1	YDR028C	10.18	0.47	-0.96	-1.98	-2.67		
SOH1	YGL127C	6.42	0.56	3.03	-0.09	-0.69		
MDM34	YGL219C	3.18	0.63	4.51	1.11	0.25	-4.66	-2.45
RVS161	YCR009C	5.11	0.69	14.53	7.75	6.63	4.11	9.36
APT1	YML022W	3.88	0.78	7.85	5.81	7.04		
CSF1	YLR087C	4.00	0.79	1.25	1.26	0.66	-1.74	7.83
EDE1	YBL047C	4.20	0.84	-0.26	-1.28	-2.20	-1.99	3.07
SUR4	YLR372W	6.93	0.92	4.27	0.83	-0.30	-1.54	8.22
ATG2	YNL242W	3.15	0.93	-0.66	-2.09	-2.29	0.27	-1.01

Tabelle 3.3

Kandidaten mit entkoppelter Cs- und Rb-Anreicherung

Alle aufgelisteten Mutanten zeigen einen deutlichen Unterschied in der Cs- und Rb-Anreicherung. Zusätzlich sind die Daten zur Sr- und Ca-Akkumulation sowie der Ionengehalt für K und Ca aufgeführt. Fett hervorgehoben sind die Mutanten, die ausschließlich für die Cs-Anreicherung Veränderungen aufweisen.

3.5.3 Die Sr- und Ca-Akkumulation unterscheiden sich fast nicht

Auch für Ca und Sr wurden vergleichende Aufnahmeversuche durchgeführt. Liegen Ca oder Sr jeweils alleine mit einer Konzentration von 0,05 mM im Puffer vor, so war die Anreicherung mit ca. 1,64 nmol Ca²⁺ pro 1x10⁷ Zellen bzw. 1,78 nmol Sr²⁺/1x10⁷ Zellen fast identisch. Waren gleichzeitig Ca und auch Sr zu je 0,05 mM im Puffer vorhanden, so betrug die Aufnahme für beide Ionen ca. 1,1 nmol/1x10⁷ Zellen. Es konnten somit keine Unterschiede in der Akkumulation beider Ionen im Wildtyp festgestellt werden.

In einem ersten Schritt wurde die Ca-Anreicherung für 153 Kandidaten separat gemessen. Vergleich man die so erhobene Ca-Anreicherung mit den Daten für die Sr-Anreicherung aus den vorhergehenden Untersuchungen, lies sich eine positive Korrelation mit r₁ = 0,79 messen (Abb. 3.11). Diese Korrelation ist stärker als es für Rb und Cs der Fall ist (Vergleich r_{Cs,Rb} = 0,65).

Wurde die Akkumulation von Ca und Sr simultan bestimmt, ergab sich eine nahezu vollständige Korrelation zwischen beiden Elementen mit r₂ = 0,96. Die Unterschiede in der Korrelation (r₁ = 0.79 zu r₂ = 0.96) lagen in erster Linie an leichten Veränderungen in der Sr-Akkumulation bei einigen Mutanten, wenn gleichzeitig Ca im Puffer vorlag. Die Ca-Anreicherung hingegen zeigte keine größeren Veränderungen. Von den untersuchten 153 Mutanten wiesen 100 keine ausgeprägten Abweichungen in der Sr-Akkumulation auf. Die restlichen Kandidaten (n=53) unterlagen Veränderungen in ihrer Sr-Akkumulation, die in 3 Kategorien eingeteilt werden können:

- i) Der Sr-Phänotyp fiel weniger extrem aus (n=26): 23 Mutanten, die in den vorhergehenden Untersuchungen eine sehr hohe Sr-Akkumulation zeigten, wiesen bei der Anwesenheit von Ca nur noch eine moderat, erhöhte Anreicherung auf. Weitere drei Mutanten wiesen eine weniger starke Reduktion der Sr-Akkumulation auf als in vorangegangenen Messungen. Tendenziell blieb das Verhalten dieser 26 Kandidaten gleich, es veränderte sich aber hinsichtlich der absoluten Anreicherungswerte und das Auswahlkriterium für die Mutanten, ein Z-Score größer als 2,5 bzw. kleiner als -2,5, wurde nicht mehr erfüllt.
- ii) Der Sr-Phänotyp fiel extremer aus (n=8): Unter den 153 untersuchten Mutanten sind auch Kandidaten, die aufgrund ihrer Cs-Anreicherung ausgewählt wurden. Einige dieser Mutanten mit Cs-Phänotyp zeigten gleichzeitig eine leicht verminderte Anreicherung für Sr. Bei simultaner Bestimmung der Sr- und Ca-Anreicherung konnte acht dieser Kandidaten nun einer Sr-Anreicherung assoziiert werden, die den Auswahlkriterien von einem Z-Score $\leq -2,5$ entsprachen.
- iii) Der Sr-Phänotyp änderte sich grundlegend (n=19): 19 Mutantenstämme zeigten einen vollständig anderen Phänotyp für die Sr-Anreicherung, wenn diese in der Anwesenheit von Ca ermittelt wurde. 15 Kandidaten wurden in den ersten Untersuchungen mit einer erhöhten Sr-Akkumulation assoziiert, zeigten bei Ca/Sr-Simultanmessungen aber nur Wildtyp-Verhalten. Andererseits zeigten 4 Mutanten, für die vorher keine Auffälligkeiten in der Sr-Anreicherung bekannt waren, eine drastisch reduzierte Akkumulation.

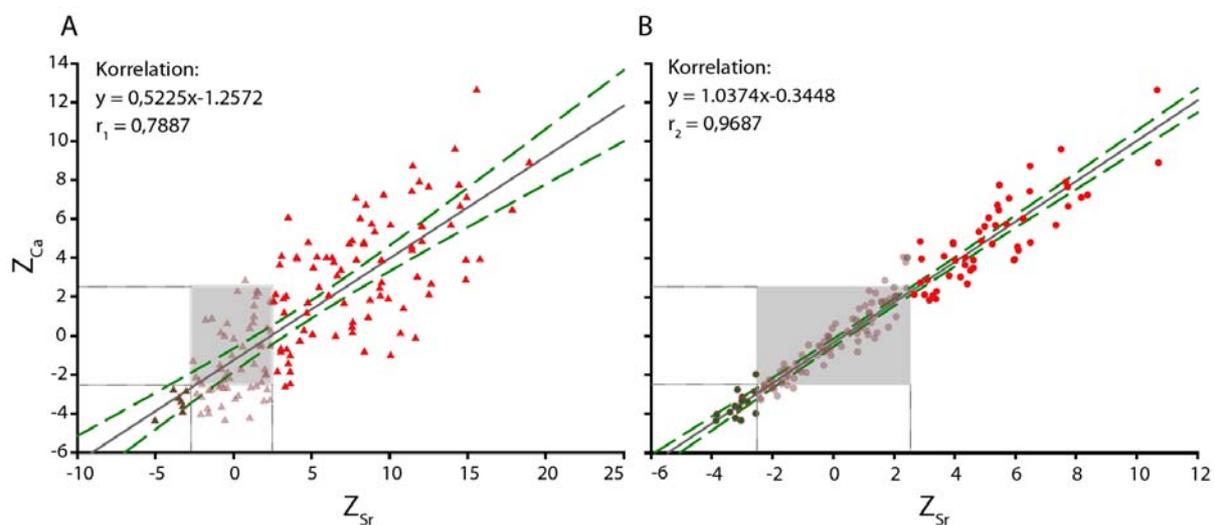


Abbildung 3.11

Korrelation zwischen Ca- und Sr-Anreicherung

In den beiden Diagrammen sind jeweils die Z-Scores für die Sr- und Ca-Anreicherung gegeneinander aufgetragen. Grün dargestellte Daten repräsentieren Mutanten mit vermindelter Sr-Anreicherung, rot jene mit erhöhter Sr-Anreicherung. Der grau unterlegte Bereich entspricht Wildtypverhalten. A) Die Sr- und Ca-Anreicherung wurde getrennt bestimmt, der Korrelationskoeffizient beträgt $r_1 = 0,79$. Es liegt eine ausgeprägte, positive Korrelation vor. B) Die Ca- und Sr-Anreicherung wurden gleichzeitig bestimmt. Bei diesen Messungen lässt sich eine fast vollständige Korrelation zwischen Ca und Sr herstellen ($r_2 = 0,97$).

Größtenteils kann man nur geringe Unterscheidung bei der Aufnahme und Anreicherung von Ca und Sr in den Hefezellen feststellen. Die hier geschilderten Ausnahmefälle deuten in erster Linie darauf

hin, dass die Präsenz von Ca die exzessive Sr-Akkumulation in verschiedenen Hefemutanten abmildert. Die Aufnahme von Ca wird von der Hefezelle strikt reguliert. Dies geschieht in erster Linie durch Proteine, die Ca-abhängig agieren (z. B. Calcineurin). Dass heißt, durch die Bindung von Ca werden regulatorische Mechanismen gesteuert, die die Ca-Homöostase beeinflussen. Da Ca und Sr nicht exakt die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften besitzen, ist es möglich, dass Sr vielleicht nicht im gleichen Maße von diesen Proteinen gebunden wird und so die Regulation weniger strikt erfolgt.

3.5.4 Eine veränderte Sr-Akkumulation ist oftmals mit Störungen im Ca-Haushalt assoziiert

Mutanten mit einer veränderten Sr-Aufnahme zeigten nur in geringem Umfang Veränderungen im K-Haushalt (5 % mit verändertem K-Gehalt und 7 % mit verändertem K- und Ca-Haushalt). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass zwischen Sr-Aufnahme und K-Haushalt ein ausgeprägter Zusammenhang besteht. Im Gegensatz dazu zeigte über die Hälfte der untersuchten Mutanten Veränderungen im Ca-Gehalt (46 % mit verändertem Ca-Gehalt plus 7 % mit verändertem K- und Ca-Haushalt).

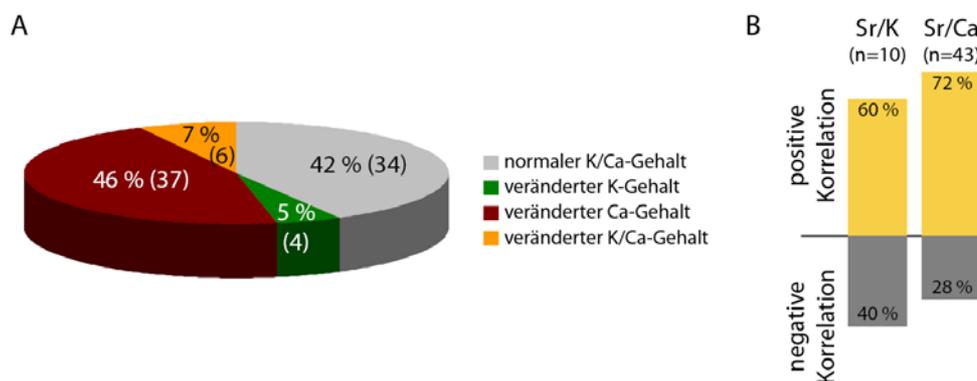


Abbildung 3.12

K- und Ca-Gehalt von Mutanten mit einer gestörten Cs-Akkumulation

A) Zusammenfassung des K- und Ca-Gehalt aller Mutanten mit Sr-Phänotyp. Ungefähr gleiche Anteile der Mutanten zeigen i) keine Veränderungen im K- oder Ca-Gehalt (grau, 42%, n=34) oder haben Störungen in der Ca-Homöostase (rot, 46%, n=37). Störungen im K-Haushalt finden sich unter den Mutanten veränderter Sr-Anreicherung fast nicht (insgesamt n=10). B) Korrelation zwischen Sr-Akkumulation und Ca- bzw. K-Gehalt. Fast Dreiviertel der Mutanten, die gleichzeitig Veränderungen im zellulären Ca-Level aufweisen, zeigen eine positive Korrelation zwischen dem Ca-Gehalt und der Sr-Anreicherung. D.h. Zellen die viel Sr akkumulieren zeigen meist auch einen erhöhten Ca-Gehalt.

In der Regel war dabei eine positive Korrelation zwischen Ca-Gehalt und Sr-Aufnahme nachzuweisen (in 72 % der Fälle). Mutanten mit vermehrter Sr-Aufnahme zeigten somit meist auch einen erhöhten Ca-Gehalt. Wie in den vorangegangenen Versuchen, kann auch hier auf eine geringe Unterscheidung der Zelle zwischen Ca und Sr geschlossen werden.

3.6 Funktionelle Klassifizierung aller 212 Kandidatengene

In der genomweiten Aufnahmestudie für Cs und Sr wurden 212 Mutanten identifiziert, die Veränderungen in der Anreicherung dieser beiden Ionen aufwiesen (siehe Abschnitt 3.3). Diese Mutanten wurden entsprechend ihres Aufnahme-Phänotyps in drei Gruppen eingeteilt: a) Mutanten mit veränderter Cs-Anreicherung, b) mit veränderter Sr-Akkumulation und c) mit veränderter Cs- und Sr-Anreicherung. Die Genprodukte aller ausgewählten Mutanten wurden im Rahmen einer Literatur- und Datenbankrecherche hinsichtlich ihrer Funktion und Lokalisation untersucht (Abbildung 3.13).

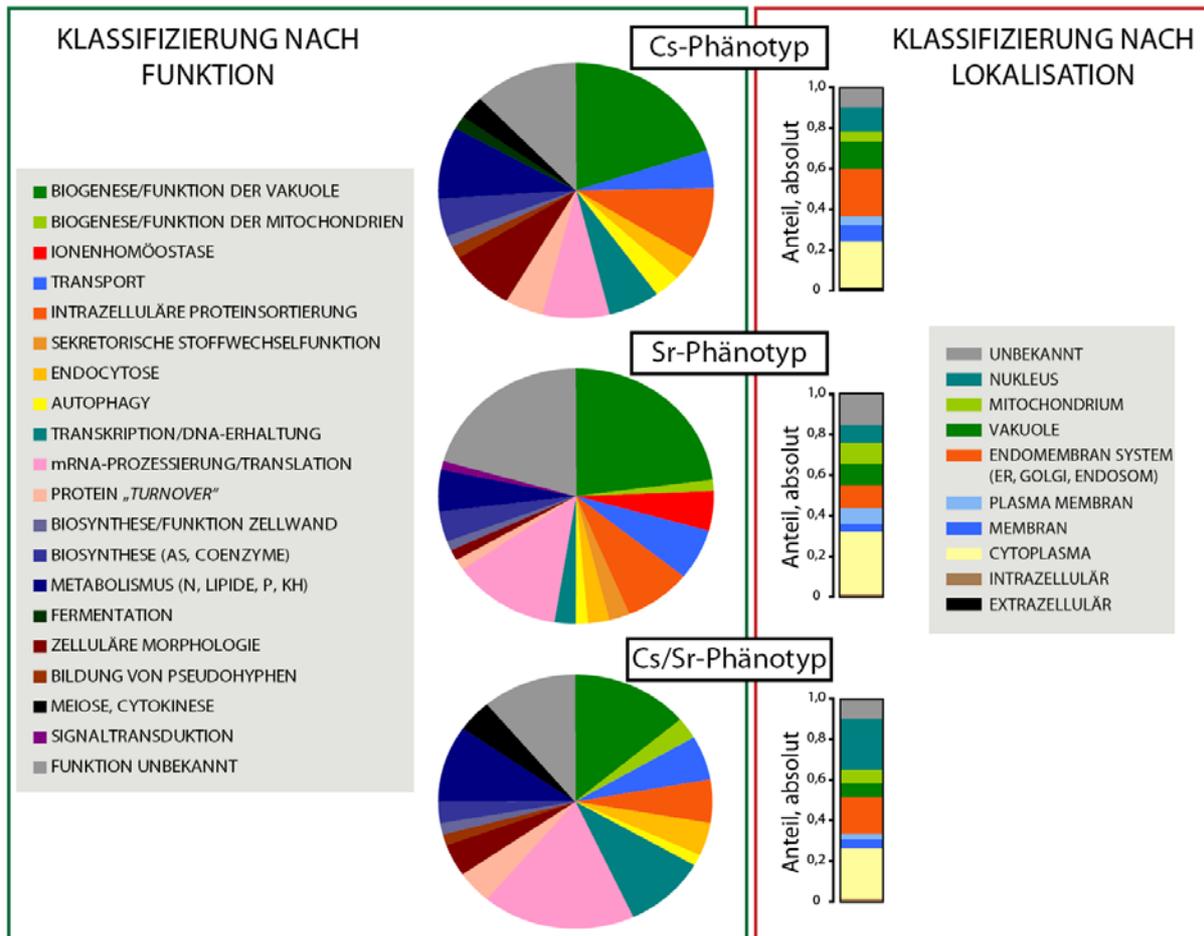


Abbildung 3.13

Überblick über Funktion und Lokalisation der identifizierten Genprodukte

Die identifizierten Kandidaten sind in drei Gruppen eingeteilt entsprechend ihres Phänotyps. Die Kreisdigramme repräsentieren den Anteil der Genprodukte an den unterschiedlichen zellulären Funktionen. In allen drei Gruppen sind Gene, die zur Funktion und Biogenese der Vakuole beitragen stark überrepräsentiert. Die Balkendiagramme geben die Lokalisation der Genprodukte in der Zelle an. Genprodukte, deren Deletion zu einer veränderten Cs-Anreicherung führen, sind häufig mit dem Endomembransystem assoziiert.

Die identifizierten Kandidaten in allen drei Gruppen wiesen Deletionen für Genprodukte auf, die an unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Auffällig ist, dass in allen drei Gruppen Genprodukte überrepräsentiert sind, die zur Biogenese und Funktionalität der Vakuole beitragen (20 % aller identifizierten Kandidaten; p im Durchschnitt kleiner 1×10^{-10}). Die Vakuole scheint demzufolge eine zentrale Rolle bei der Cs- und Sr-Aufnahme bzw. -anreicherung zu spielen. Dies könnte in erster

Linie mit ihrer Funktion als Speicherreservoir zusammenhängen. Des Weiteren ist die Vakuole in die Ionenhomöostase und Osmoregulation der Hefezelle involviert und könnte somit ebenfalls Einfluss auf Aufnahme und Abgabe der Ionen haben (Nelson 2003). Im Gegensatz dazu konnten lediglich 5% aller ausgewählten Mutanten mit Transportprozessen über Membranen assoziiert werden.

Für knapp 15 % aller identifizierten Gene (n=32) wurde bisher noch keine Funktion beschrieben. In 21 Fällen handelt es sich dabei um vorhergesagte ORFs („ORF = Open Reading Frame“, entspricht einem kodierenden Bereich), die nach aktuellen Erkenntnissen nicht für ein funktionelles Protein kodieren oder mit ORFs überlappen, die für andere, bereits beschriebene Proteine kodieren (welche in dieser Untersuchung ebenfalls identifiziert wurden). Die Deletion dieser vorhergesagten ORFs führt möglicherweise nur indirekt zu einem überlappenden Phänotyp, da das zweite, funktionelle Gen ebenfalls zerstört wurde. Eine Gruppe von 11 nicht charakterisierten ORFs codiert hingegen für potentielle Proteine, deren Funktion noch nicht untersucht wurde (YDR090C, YGR125W, YDR089W, YMR010W, YOR305W, YCR062W, YOL162W, MTC1, LRC5, IRC6 und YLR414C).

Die verbleibenden 60 % der identifizierten Genprodukte spielen in so unterschiedlichen Prozessen wie der Organellbiogenese, der Proteinsortierung und Sekretion, der Transkriptions- und Translationsregulation, im Metabolismus bis hin zur Regulation der Zellmorphologie und Meiose eine Rolle. Im Folgenden werden die drei Kandidatengruppen einzeln betrachtet und die wichtigsten Aspekte hervorgehoben (für nähere Details siehe Abbildung 3.13, Zusammenfassung in Tabelle 3.4):

- i) Kandidaten mit einer veränderten Cs-Aufnahme sind weiterhin defizient in Genen, die im Bereich der intrazellulären Proteinsortierung, Endocytose und Autophagie funktionell sind (15 %). Weitere 9 % der identifizierten Genprodukte erfüllen Aufgaben im Metabolismus der Hefezellen, wobei es sich primär um den Stickstoff- und Lipidmetabolismus handelt. Eine dritte größere Gruppe von Kandidatengenen (8 %) hat Einfluss auf Prozesse, die zur Regulation der zellulären Morphologie beitragen (Zellpolarität, Knospung). Betrachtet man die Lokalisation der identifizierten Genprodukte, so sind überproportional viele von ihnen mit dem Endomembransystem und der Vakuole assoziiert (37 %).
- ii) Kandidaten mit einer veränderten Sr-Aufnahme zeigen außerdem Deletionen in Genen, die in der mRNA-Prozessierung bzw. Translation eine Rolle spielen (13 %) oder an der intrazellulären Proteinsortierung, Endocytose und Autophagie teilhaben (12 %). Die dritte größere Fraktion stellen wie bei Kandidaten mit Cs-Phänotyp ebenfalls Genprodukte, die im Metabolismus und in Biosyntheseprozessen eine Rolle spielen. Auch hier kommt dem Lipidmetabolismus eine zentrale Rolle zu. Diese Kandidatengruppe umfasst in erster Linie cytosolische Proteine (32 %). Zusätzlich ist für einen Anteil von 16 % der Proteine die Lokalisation noch nicht bekannt.
- iii) Die letzte Gruppe von Kandidaten zeigte für beide Ionen ein abweichendes Aufnahmeverhalten. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Mutanten vor allem allgemeine Prozesse betroffen sind, deren Beeinträchtigung zu pleiotropen Wirkungen führen. Eine veränderte Cs- und Sr-Aufnahme ist wahrscheinlich eher indirekter Natur. Tatsächlich sind in dieser Kandidatengruppe vor allem Genprodukte zu finden, die mit der mRNA-Prozessierung bzw. Translation (18 %) und der Erhaltung der DNA-Struktur sowie Transkription (10 %) assoziiert werden können. Diese Gruppe zeichnet sich vor allem durch viele nukleäre Kandidatenproteine aus (25 %), weiterhin

können je 25 % der Proteine im Cytosol gefunden werden oder sind mit dem Endomembransystem assoziiert.

Tabelle 3.4 Zusammenfassung aller Messungen mit den 212 Kandidatenstämmen (alphabetisch geordnet nach Name)

Gen	ORF	Anreicherung				zell. Gehalt		Toxizität						Klassifizierung				
		Z ₀	Z _{4b}	Z ₅	Z ₅ (Ca)	Z ₀	Z _k	100 mM CsCl	800 mM KCl	1 M NaCl	300 mM RbCl	100 mM LiCl	250 mM SrCl ₂	250 mM CaCl ₂	250 mM MgCl ₂	Lokalisation	Funktion	
ADE3	YGR204W	6.67		2.15		1.16	1.95	3.04								NB	N	Aminosäurebiosynthese (MET, HIS)
APL2	YKL135C	-4.73	-2.10	3.25	1.19	1.60	0.42	1.45								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
APL4	YPR029C	-3.66	-0.72	2.36	1.60	1.75	0.27	1.91								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
APL6	YPL195W	-3.44	-1.26	-1.67	-3.11	-3.76	-2.03	-2.91								WT	WT	intrazell. Proteintransport (AP-3 Komplex); Vesikeltransport
APL5	YGR261C	-3.03	-1.61	-0.79	-1.50	-2.55	0.27	-1.77								WT	WT	intrazell. Proteintransport (AP-3 Komplex); Vesikeltransport
APM1	YPL259C	-4.81	-2.59	0.26	3.42	2.27	-1.76	-0.46								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
APM3	YLR170C	-3.74	-1.53	1.59	1.41	2.19	-3.78	-0.85								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
APM5	YJL024C	-3.32	-0.77	-0.77	-3.10	-3.68	1.74	-0.31								WT	WT	intrazell. Proteintransport (AP-3 Komplex); Vesikeltransport
APT1	YML022W	3.88	0.78	7.85	5.81	7.04										NB	NB	Biosynthese (Purin)
ARF1	YDL192W	-3.58	-1.58	6.10	3.29	2.04	1.52	11.72								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
ARG82	YDR173C	0.95		2.94												NB	N	Lipidmetabolismus (Phospholipide)
ATG14	YBR138C	3.24	2.46	2.81	-1.73	-1.87	2.74	1.63								NB	NB	Autophagozytose
ATG17	YLR423C	2.66	2.18	-0.78	-1.42	-1.74	0.16	-0.16								WT	WT	Autophagozytose
ATG2	YNL242W	3.15	0.93	-0.66	-2.09	-2.29	0.27	-1.01								WT	WT	Autophagozytose
ATG5	YPL149W	3.22	1.86	-3.03	-2.59	-2.88	1.07	2.07								NB	NB	Autophagozytose
BEM1	YBR200W	4.48	1.32	-0.87	-0.30	-1.53	-2.44	0.46								WT	WT	Zellpolartät
BUD20	YLR074C	6.08	1.72	8.39	-0.25	-0.84	-3.57	1.37								NB	NB	Knospfung
BUD21	YOR078W	4.38	1.16	11.48	6.50	8.70										NB	N	mRNA-Prozessierung/Translation
BUD23	YCR047C	1.79	1.07	9.38	2.44	2.44	-3.60	1.48								NB	NB	Knospfung; Cytokinase
CAC2	YML102W	2.72		5.05												NB	NB	DNA-Erhaltung
CAP2	YIL034C	4.78	0.36													NB	N	Zellpolartät
CHS5	YLR330W	1.40		4.46												NB	NB	Sekretion; Transport
CIK1	YMR198W	3.08	1.09	11.43	6.49	7.40	3.82	2.51								NB	NB	Meiose
CLB4	YNL298W	2.71		-0.03												NB	NB	Knospfung; Proteinmodifizierung
COO6	YGR255C	1.35		4.71												NB	NB	Biosynthese (Ubiquinon)
CSE2	YNR010W	3.20	-0.42	5.96	4.37	3.99										WT	WT	Regulation der Transkription
CSE1	YLR087C	4.00	0.79	1.25	1.26	0.66	-1.74	7.83								WT	WT	Fermentation
CTK1	YKL139W	5.26	1.76	0.59	-0.40	-0.59										NB	NB	Regulation der Transkription; Proteinmodifizierung
CTR1	YPR124W	0.87		2.62												NB	NB	Transport (Cu)
CUP5	YEL027W	-6.27	-0.72	0.32	-1.83	-3.11										WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Zell. Homöostase
CYK3	YDL117W	3.88	-0.31	1.10	-2.00	-2.68	3.98	5.24								NB	NB	Cytokinase
DID2	YKR035W-A	-0.70	-0.94	8.85	5.72	5.72	-0.12	1.17								WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport
DID4	YKL002W	-1.38	0.81	6.89	4.53	3.34	1.69	7.12								WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport
DOA4	YDR069C	2.16		4.93												NB	NB	Protein "Turnover"; Proteinmodifizierung
EAF7	YNL136W	3.71		4.67												WT	WT	DNA-Erhaltung; Proteinmodifizierung
ECM33	YBR078W	2.82	0.84	-0.21	-1.28	-2.20	-1.99	3.07								NB	NB	Biogenese/Fkt. der Zellwand
EDE1	YBL047C	4.20	0.84	-0.26	-1.28	-0.72										NB	NB	Endozytose; Vesikeltransport
ELP3	YPL086C	3.15		5.79												NB	NB	mRNA-Prozessierung/Translation
ENT4	YLR038C	-2.78		-0.45												WT	WT	Funktion unbekannt
ERG2	YMR202W	-1.85	-2.95	14.95	8.19	7.08	-2.63	5.14								WT	WT	Lipidmetabolismus (Sterole)
ERG3	YLR056W	3.29		3.03												WT	WT	Lipidmetabolismus (Sterole)
ERG6	YML008C	2.30		3.35												WT	WT	Lipidmetabolismus (Sterole)
FCY2	YER056C	-2.71	-0.85	-1.39	0.66	0.86	-3.10	1.88								WT	WT	Transport (Purin, Cytosin)
FPS1	YLR043W	3.97	0.33	-0.11	-1.01	-1.02	0.05	1.25								WT	WT	Transport (Glycerol)
FRB8	YLR047C	1.82	0.10	-3.85	-2.28	-2.80	-4.52	6.67								WT	WT	Metalionen-Homöostase (Cu/Fe); Zell. Homöostase
GCN1	YGL195W	2.45	0.19	6.43	2.41	3.76	0.24	-4.61								WT	WT	mRNA-Prozessierung/Translation
GCN2	YDR283C	0.89	0.23	7.43	3.97	4.71	-2.28	1.38								WT	WT	mRNA-Prozessierung/Translation
GC2	YNL199C	4.67	1.29	3.41	-0.20	-0.72										WT	WT	Kohlenhydratmetabolismus; Regulation der Transkription
GC51	YDL226C	-4.77	-3.86	12.51	7.74	7.63	1.08	7.98								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
GEE1	YLR040W	-4.18	-1.11	3.08	3.67	4.07	0.10	4.15								WT	WT	Transport; Zell. Homöostase
GMH1	YKR030W	0.14		2.72												WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport
GOS1	YHL031C	-2.44	-1.73	2.70	2.68	2.10	-0.25	2.53								WT	WT	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
GPH1	YPR160W	2.96	-1.19	14.90	5.97	3.88	1.28	2.90								WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport

S= sensitiv; se= gering sensitiv; WT=Wildtyp-Verhalten; NB= nicht bestimmt

B=Bud/Knospe; C=Cytosol; dub=dubios; EM=Endomembransystem; END=Endosom; ER=Endoplasmatisches Retikulum; EZ=Extrazellulär; G=Goilgr-Apparat; HZ=Intrazellulär; M=Membran; MIT=Mitochondrien; N=Nukleus; NUK=Nukleolus; PM=Plasmamembran; R=Ribosomen; Va=Vakuole; U=Unbekannt; ZK=Zellkortex;

Tabelle 3.4 Zusammenfassung aller Messungen mit den 212 Kandidatenstämmen (Fortsetzung)

Gen	ORF	Anreicherung				zell. Gehalt		Toxizität					Klassifizierung								
		Z _{Ca}	Z _{Rb}	Z _{Sr}	Z _{Sr} (Ca)	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}	Z _K	100 mM CsCl	800 mM KCl	1 M NaCl	300 mM RbCl	100 mM LiCl	250 mM SrCl ₂	250 mM CaCl ₂	250 mM MgCl ₂	Lokalisation	Funktion		
HIS7	YBR248C	0.97		5.41																Aminosäurebiosynthese (HIS)	
HOC1	YJR075W	5.24		7.39																	Biogenese/Fkt. der Zellwand; Kohlenhydratmetabolismus
HOM6	YJR139C	4.47	-0.96	8.63	1.34	0.93															Aminosäurebiosynthese (MET, THR)
HOP2	YGL033W	2.88		0.18																	Meiose
INP53	YOR109W	3.81	-1.73	2.58	1.73	1.75															Lipidmetabolismus (Phospholipide); Vesikeltransport
IRC13	YOR235W	2.32	0.36	5.48	2.02	2.47															Funktion unbekannt (dubios)
IRC6	YFR043C	-2.68		-0.86																	Funktion unbekannt
IST3	YIR005W	7.44		8.57																	mRNA-Prozessierung/Translation
JUJ1	YNL227C	4.38		3.58																	Endozytose
KHA1	YIL094C	-2.78	-0.31	1.31	2.09	0.97															Transport (K/H)
LAS21	YJL062W	4.51	2.03	1.04	-0.02	0.36															Lipidmetabolismus (Phospholipide)
LSB4	YOR171C	-3.44	-2.47	0.02	-0.11	-0.17															Lipidmetabolismus (Sphingolipide)
LSM1	YIL124C	1.40		4.66																	mRNA-Prozessierung/Translation
LS14	YKL176C	5.81	0.35	-0.40	-2.27	-2.70															Stickstoffmetabolismus; Vesikeltransport
MM43	YOL060C	-0.32	0.73	11.91	7.68	7.88															Funktion der Mitochondrien
MC45	YOR306C	-2.35	-1.98	18.96	10.73	8.87															Transport (RIBOFLAVIN)
MDM34	YGL219C	3.18	0.63	4.51	1.11	0.25															Transport (K/H)
MET7	YOR241W	7.20		0.56																	Funktion der Mitochondrien
MGM101	YJR144W	5.77	-0.06	7.60	1.84	0.43															Aminosäurebiosynthese (MET)
MON2	YNL297C	-3.72	-1.75	3.63	-0.51	-1.04															Funktion der Mitochondrien
MSN5	YDR335W	5.37		4.94																	Endozytose; Transport
NHA1	YLR138W	2.00	-0.37	-3.25	-3.22	-3.64															Protein "Turnover"; Transport
NHX1	YOR456W	-2.41	-3.01	4.79	6.51	4.78															Ionen-Homöostase (Na/K/H); zell. Homöostase
NPR1	YNL183C	-2.88	-0.40	0.75	1.72	2.82															Transport; zell. Homöostase
NPR2	YEL062W	-3.34	-1.02	4.05	2.46	4.01															Stickstoffmetabolismus; Proteinmodifizierung
NIUP120	YKL057C	2.83		14.06																	Stickstoffmetabolismus; Reaktion auf chemische Stimulus
OP1	YHL020C	3.31		-0.71																	mRNA-Prozessierung/Translation
OP7	YDR360W	1.18		6.31																	Regulation der Transkription
OPB8	YKR035C	-0.30	-1.37	9.41	2.10	2.03															Funktion unbekannt (dubios)
IPAP2	YGR078C	2.61		1.73																	Funktion unbekannt (dubios)
IPD1	YOL115W	4.13		-0.54																	Protein "Turnover"; Biogenese/Fkt. des Cytoskeletts
PEP12	YOR036W	-2.75	-2.98	15.80	5.99	3.91															Regulation der Transkription
PEP1	YIL179W	4.68		1.06																	Kohlenhydratmetabolismus; Glucosemetabolismus
PMK1	YGL006W	0.18	-0.12	-5.03	-3.84	-4.37															Biogenese/Fkt. der Vakuole; Vesikeltransport
PMK3	YDR276C	4.18	-1.00	7.08	1.91	1.66															Protein "Turnover"; Biogenese/Fkt. des Cytoskeletts
POSS	YPL188W	1.23		3.36																	Signal-Transduktion; zell. Homöostase
PPA1	YHR026W	-5.36	-2.39	3.32	-2.02	-2.63															Transport (Ioni); zell. Homöostase
PPQ1	YPL179W	2.75		11.42																	Biosynthese (NADPH)
PPZ1	YML016C	0.38	2.10	4.07	2.92	3.93															Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
RAV1	YJR033C	-3.61	-2.15	17.87	5.47	6.44															mRNA-Prozessierung/Translation
RAV2	YDR202C	-1.83	-0.73	4.77	1.63	1.68															Ionen-Homöostase (K); zell. Homöostase
RCY1	YIL204C	-0.61	-1.11	7.88	4.63	3.88															Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
REG1	YDR028C	10.18	0.47	-0.96	-1.98	-2.67															Endozytose
RHB1	YCR027C	-0.50		6.03																	Kohlenhydratmetabolismus (Glycogen)
RHO4	YKR055W	2.83	-0.56	9.48	4.04	3.86															Transport (ARG, LYS)
RMD11	YHL023C	-2.81	-0.80	5.35	2.32	4.03															Transport (ARG, LYS)
RNY1	YPL123C	2.95		-1.91																	Meiose
ROM2	YLR371W	0.46	-0.41	-3.50	-2.37	-3.23															zelluläre Morphologie
RPA14	YDR156W	4.29		6.60																	Endozytose
RPE1	YIL121C	-0.31	-0.20	6.33	2.46	3.99															Regulation der Transkription
RPL16A	YIL133C	5.33		5.93																	Kohlenhydratmetabolismus
RPL16B	YNL069C	1.54		7.83																	mRNA-Prozessierung/Translation

S= sensitiv; s= gering sensitiv; WT=Wildtyp-Verhalten; NB= nicht bestimmt
 B=Bud/Knope; C=Cytosol; dub=dubios; EM=Endomembransystem; END=Endosom;
 ER=Endoplasmatisches Retikulum; EZ=Extrazellulär; G=Golgi-Apparat;
 IZ=Intrazellulär; M=Membran; MIT=Mitochondrien; N=Nukleus; NUK=Nukleolus; PM
 =Plasmamembran; R=Ribosomen; V=Vakuole; U=Unbekannt; ZK=Zellkortex;

Tabelle 3.4 Zusammenfassung aller Messungen mit den 212 Kandidatenstämmen (Fortsetzung)

Gen	ORF	Anreicherung				zell. Gehalt		Toxizität						Klassifizierung			
		Z _{Cs}	Z _{Rib}	Z _{Sr}	Z _{Sr} (Ca)	Z _K	Z _{Ca}	100 mM CsCl	800 mM KCl	1 M NaCl	300 mM RbCl	100 mM LiCl	250 mM SrCl ₂	250 mM CaCl ₂	250 mM MgCl ₂	Lokalisation	Funktion
RPL19B	YBL027W	5.00		-0.43				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPL21B	YPL079W	4.08		0.40				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPL40B	YKR094C	1.41		3.24				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (MIT)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPL9B	YNL067W	5.08		7.05				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPL1B	YDL130W	3.50		2.11				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS10B	YMR230W	3.21		9.03				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS11B	YBR048W	2.32		7.73				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS16B	YDL083C	1.85		8.36				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS19B	YNL302C	2.86		8.36				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS27B	YLR367W	1.80		3.76				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS24B	YIL069C	4.67		4.96				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS28A	YOR167C	2.26		5.98				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS29B	YDL061C	3.32		10.64				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	mRNA-Prozessierung/Translation
RPS7A	YOR096W	1.03		12.59				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N (NUK)	mRNA-Prozessierung/Translation
RRP6	YOR001W	4.03	1.32	7.61	4.90	4.86		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Meliose
RTT101	YJL047C	5.53		5.29				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N (C)	Zellpolarität
RVS161	YCR009C	5.11	0.69	14.53	7.75	6.63		S	NB	S	WT	NB	NB	NB	NB	C (ZK)	Wachstum von Pseudohyphen
RX12	YBR095C	3.34		-0.03				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Zellpolarität
SAC6	YDR129C	-3.10	-2.36	1.72	0.29	-0.57		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (ZK)	Zellpolarität
SAM3	YPL274W	2.28		2.72				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (PW)	Transport (S-ADE-MET)
SCP160	YJL080C	4.80		-0.69				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Regulation der Transkription
SEC28	YIL076W	-2.28	-0.39	10.70	0.80	0.12		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	EM (ER)	mRNA-Prozessierung/Translation
SFN1	YDR477W	3.16		7.30				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	G (END)	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport
SFN7	YLR025W	-1.74	-1.35	5.06	1.17	0.05		WT	NB	S	WT	NB	NB	NB	NB	EM (C)	Regulation der Transkription; Proteinmodifizierung
SOH1	YGL127C	6.42	0.56	3.03	-0.09	-0.69		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport
SPF1	YEL031W	-0.96	0.30	8.12	6.27	6.01		S	NB	WT	WT	NB	NB	NB	NB	N	Telomer-Erhaltung
SRB2	YHR041C	5.10	1.41	7.63	1.46	0.14		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Ionen-Homöostase (Ca)
SR88	YCR081W	-0.95	-0.16	5.12	4.63	3.48		S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Regulation der Transkription
SRN2	YLR119W	0.99	-0.41	12.07	5.01	5.60		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	intrazell. Proteintransport; Transport
STP22	YGL008C	0.84	-0.94	8.35	5.25	4.70		WT	NB	WT	NB	NB	NB	NB	NB	C	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport
STV1	YMR054W	-5.00	-2.21	1.42	2.05	1.99		WT	WT	WT	WT	NB	NB	NB	NB	G (V)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
SUR4	YLR372W	6.93	0.92	4.27	0.83	-0.30		S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	ER	Lipidmetabolismus; (Sphingolipide)
SWC3	YAL011W	0.60		2.72				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	DNA-Erhaltung
SYF2	YGR129W	-2.63	-0.64	1.49	1.20	2.29		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	mRNA-Prozessierung/Translation
TAN1	YGL232W	2.44		3.70				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N (C)	mRNA-Metabolismus (tRNA)
TEF4	YKL081W	-5.72	-2.23	9.05	4.81	5.33		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N (C)	mRNA-Prozessierung/Translation
TFP1	YDL185W	-6.51	-0.72	2.36	-0.46	-0.54		S	WT	WT	WT	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
TFP3	YPL234C	-6.41	-2.53	1.80	-1.69	-2.41		WT-R	S	WT	WT	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
TMA22	YJR014W	2.02		4.66				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C (R)	Funktion unbekannt
TOM1	YDR457W	4.58		3.56				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N (NUK)	Funktion unbekannt
TPO1	YLR028W	2.57	0.34	-2.59	-0.84	-1.32		WT-R	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	V	Protein Turnover; Proteinmodifizierung
TPS2	YDR074W	11.76	1.01	10.89	0.87	1.38		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	V	Transport (Polyamine)
TRK1	YIL129C	4.69	0.09	14.89	3.12	2.85		S	WT	S	WT	NB	NB	NB	NB	MIT (C)	Kohlenhydratmetabolismus
TRPS	YGL026C	3.03		0.76				S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	PM (Lipid Raft)	Transport; zell. Homöostase
UBP11	YKR098C	0.51		3.47				WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	N	Aminosäuresynthese (TRP)
URP3	YER151C	-3.77	-0.24	2.15	0.89	0.37		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	U	Funktion unbekannt
VAM10	YOR068C	-2.71	1.00	-0.55	-3.02	-4.36		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	C	Protein Turnover; Proteinmodifizierung
VAM3	YOR106W	-2.14	-0.47	14.19	7.52	9.56		WT	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole
VAM6	YDL077C	-2.64	-0.06	14.45	5.49	7.73		S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole
VAM7	YGL212W	-4.28	-1.21	8.48	5.42	6.69		S	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Vesikeltransport
VMA2	YBR127C	-6.54	-2.23	1.32	-1.61	-1.48		WT-R	S	WT	WT	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VMA21	YGR105W	-4.97	-2.07	3.64	-1.69	-2.49		WT-R	S	WT	WT	NB	NB	NB	NB	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VMA22	YHR060W	-6.53	-2.01	2.07	-2.53	-2.00		WT-R	S	WT	WT	NB	NB	NB	NB	EM (ER)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase

S= sensitiv; S= gering sensitiv; WT=Wildtyp; Verhalten; NB= nicht bestimmt
 B=Bud/Knoepe; C=Cytosol; dub=dubios; EM=Endomembransystem; END=Endosom;
 ER=Endoplasmatisches Retikulum; EZ=Extrazellulär; G=Golgi-Apparat;
 IZ=Intrazellulär; M=Membran; MIT=Mitochondrien; N=Nukleus; NUK=Nukleolus; PM
 =Plasmamembran; R=Ribosomen; V=Vakuole; U=Unbekannt; ZK=Zellkortex;

Tabelle 3.4 Zusammenfassung aller Messungen mit den 212 Kandidatenstämmen (Fortsetzung)

Gen	ORF	Anreicherung					zell. Gehalt		Toxizität						Klassifizierung			
		Z _{CS}	Z _{Rb}	Z _{Er}	Z _{Ca}	Z _{Ca}	Z _k	Z _{Ca}	100 mM CsCl	800 mM KCl	1 M NaCl	300 mM RbCl	100 mM LiCl	250 mM SrCl ₂	250 mM CaCl ₂	250 mM MgCl ₂	Lokalisation	Funktion
VMAA4	YOR332W	-6.49	-2.09	2.08	-1.48	-2.05	6.76	-5.12	WT-R	S	S	WT	WT	S	S	S	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VMAA5	YKLO80W	-6.45	-2.89	1.47	-2.24	-2.61	7.32	-7.59	WT-R	S	S	WT	WT	S	S	S	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VMAA8	YEL051W	-6.53	-2.45	2.16	-1.93	-2.79	7.81	-2.43	WT-R	S	S	WT	WT	S	S	S	V	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VPH1	YOR270C	-2.57	-0.31	4.22	-0.29	-0.31	2.39	-8.12	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	WT	WT	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VPH2	YKLI19C	-6.52	-2.18	1.95	-2.99	-3.37	7.13	-13.71	WT-R	S	S	WT	WT	S	S	S	EM (ER)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VPS1	YKRR001C	-4.21	-2.73	8.75	3.18	1.81	-0.40	92.40	WT-R	S	S	WT	WT	S	S	S	EM (ER)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; zell. Homöostase
VPS17	YOR1732W	-2.94	0.08	3.03	0.82	-0.84	0.54	7.80	S	WT	WT	WT	S	S	S	EM (END)	intrazell. Proteintransport; Vesikeltransport	
VPS20	YMR077C	1.81	-1.77	11.67	1.38	-0.14	-3.28	-1.52	WT	WT	WT	WT	S	S	S	C (M)	Biogenese/Fkt. der Vakuole	
VPS24	YKLO41W	-0.03	-0.63	11.78	4.21	3.01	-4.86	0.93	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	C (M)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS27	YNR0066W	0.85	-0.83	12.53	3.02	2.09	0.29	3.07	S	WT	WT	WT	WT	S	S	C	intrazell. Proteintransport; Transport	
VPS28	YPL0655W	1.69	-0.97	9.92	3.40	1.89	-3.92	0.96	S	WT	WT	WT	WT	S	S	C (M)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS29	YHR012W	-3.27	-1.12	-0.37	-0.87	-1.91	-3.30	1.63	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	EM (ER)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Vesikeltransport	
VPS3	YDR495C	-4.24	-3.28	11.43	6.09	4.54	-1.51	21.38	S	WT	WT	WT	WT	S	S	C	Biogenese/Fkt. der Vakuole	
VPS35	YLI154C	-3.86	-0.27	-0.63	-1.30	-2.72	-1.21	-2.45	S	WT	WT	WT	WT	S	S	EM	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Vesikeltransport	
VPS36	YLR417W	0.34	-1.53	12.67	4.44	2.66	-2.10	-0.68	S	WT	WT	WT	WT	S	S	C (M)	intrazell. Proteintransport; Transport	
VPS38	YLR360W	-1.82	-1.24	10.06	7.35	5.66	2.42	3.55	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	EM (ER)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS41	YPR173C	1.95	-0.85	9.50	2.89	2.72	0.66	9.94	S	WT	WT	WT	WT	S	S	ER (C)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS44	YDR080W	-2.34	-1.16	15.59	10.68	12.61	1.78	3.27	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	V (END)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS54	YDR027C	-3.84	-1.52	6.65	3.84	3.07	-2.89	12.42	S	WT	WT	WT	WT	S	S	G (MIT)	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VPS72	YDR485C	0.92	1.17	3.20	1.87	1.88	-	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N (C)	Biogenese/Fkt. der Vakuole	
VPS8	YAL002W	-2.06	-1.60	9.63	8.39	7.22	-0.33	21.55	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	C	Biogenese/Fkt. der Vakuole; Transport	
VRP1	YLR337C	3.14	-3.41	10.07	-0.06	-1.03	0.39	34.18	S	WT	S	WT	WT	S	S	C (ZK)	Endocytose	
VRP3	YPL019C	1.11	0.78	8.35	3.96	4.78	-0.81	1.53	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NB	Wachstum von Pseudohyphen	
WHB3	YNL197C	4.21	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	C	Funktion unbekannt (dubios)	
YBR277C	YBR277C	0.35	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	C	Funktion unbekannt	
YCL007C	YCL007C	-6.52	-3.01	3.51	-1.22	-1.45	12.30	-6.64	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U (dub)	Funktion unbekannt (dubios)	
YDR062W	YDR062W	1.15	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	C	Funktion unbekannt	
YDR089W	YDR089W	-0.80	-1.58	-3.26	-3.39	-3.94	-2.37	0.42	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	Funktion unbekannt
YDR090C	YDR090C	5.36	0.37	-0.58	-0.13	-0.04	1.61	3.68	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	M	Funktion unbekannt (dubios)	
YDR203W	YDR203W	-2.43	0.37	3.50	5.14	6.05	2.66	6.24	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	NB	Funktion unbekannt (dubios)	
YDR455C	YDR455C	-1.97	-2.85	11.44	6.12	4.38	0.40	5.99	S	WT	WT	WT	WT	S	S	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YGR125W	YGR125W	-0.12	1.30	-3.35	-2.82	-3.40	3.13	4.51	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	V	Funktion unbekannt	
YLI123C	YLI123C	2.29	4.01	4.01	4.01	4.01	4.01	4.01	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G (C)	Funktion unbekannt	
YJRI18W	YJRI18W	0.11	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NB	Funktion unbekannt (dubios)	
YKL118W	YKL118W	-6.29	-1.41	3.63	-1.04	-1.88	-	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NB	Funktion unbekannt (dubios)	
YKL136W	YKL136W	-4.38	-1.15	2.50	1.29	1.68	-0.91	-1.38	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YLR169W	YLR169W	-3.76	-1.56	1.79	-0.80	-0.49	-1.38	1.95	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YLR171W	YLR171W	-3.77	-1.32	1.32	1.07	1.52	-2.24	2.71	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U (dub)	Funktion unbekannt (dubios)	
YLR366W	YLR366W	3.57	6.87	6.87	6.87	6.87	6.87	6.87	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G (C)	Funktion unbekannt (dubios)	
YLR414C	YLR414C	2.84	8.22	8.22	8.22	8.22	8.22	8.22	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	C (B)	Funktion unbekannt	
YML101C-A	YML101C-A	2.51	4.88	4.88	4.88	4.88	4.88	4.88	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NB	Funktion unbekannt (dubios)	
YMR031W-A	YMR031W-A	2.59	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NB	Funktion unbekannt (dubios)	
YNL235C	YNL235C	0.84	0.00	6.54	-0.17	-0.04	4.11	7.04	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YNL296W	YNL296W	-3.75	-1.27	2.96	4.36	3.62	0.72	7.67	S	WT	WT	WT	WT	S	S	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YNR005C	YNR005C	1.81	-0.56	13.94	5.36	5.65	-0.61	4.90	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U (dub)	Funktion unbekannt (dubios)	
YOL050C	YOL050C	1.87	0.72	7.65	0.89	0.67	6.93	1.12	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	U	Funktion unbekannt (dubios)	
YOL162W	YOL162W	-5.06	-2.45	3.38	2.07	2.01	-0.63	-0.28	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	M	Funktion unbekannt	
YOR205C	YOR205C	3.69	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	Funktion unbekannt
YOR331C	YOR331C	-6.34	-1.13	2.34	-2.38	-3.33	6.39	-7.94	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	Funktion unbekannt (dubios)
YPK1	YKL126W	5.34	0.31	2.01	1.12	-1.76	6.04	16.55	S	S	WT	WT	WT	S	S	PM (B)	Endocytose; Proteinmodifizierung	
YPI6	YLR262C	-0.67	-1.46	4.69	1.21	1.15	2.46	21.78	S	WT	WT	WT	WT	S	S	G	Sekretion	
YPI7	YAL001W	-1.77	-0.64	12.07	2.88	4.82	0.97	0.11	S	WT	WT	WT	WT	S	S	MIT (V)	Biogenese/Fkt. der Vakuole	
YTR270W	YTR270W	3.98	3.98	3.98	3.98	3.98	3.98	3.98	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N	Protein „Turnover“	

S= sensitiv; s= gering sensitiv; WT=Wildtyp-Verhalten; NB= nicht bestimmt
 B=Bud/Knospe; C=Cyrosol; dub=dubios; EM=Endomembransystem; END=Endosom;
 ER=Endoplasmatisches Retikulum; EZ=Extrazellulär; G=Golgi-Apparat;
 IZ=Intrazellulär; M=Membran; MIT=Mitochondrien; N=Nukleus; NUK=Nukleolus; PM
 =Plasmamembran; R=Ribosomen; V=Vakuole; U=Unbekannt; ZK=Zellkortex;

3.7 Identifizierung funktioneller Proteingruppen und -komplexe

Neben der Suche nach spezifischen Kandidaten für die Cs- und Sr-Anreicherung sollten die Daten zur Cs- und Sr-Anreicherung in den Mutanten zusätzlich dazu genutzt werden, Aufschluss über Mechanismen der Cs- und Sr-Aufnahme bzw. -Akkumulation oder deren Regulation zu erhalten. Dazu wurden die Akkumulationsdaten der Kandidatenstämme einer Clusteranalyse unterzogen (Programm Cluster 3, siehe 2.2.11) mit dem Ziel funktioneller Proteinkomplexe zu identifizieren, die über eine mögliche Regulation Aufschluss geben könnten. Anhand der Clusteranalysen konnte eine Vielzahl von vps-Mutanten (vps = vacuolar protein sorting) identifiziert werden, denen eine gesteigerte Sr-Anreicherung gemeinsam ist. Dabei zeigte eine Untergruppe gleichzeitig auch eine verminderte Cs-Anreicherung. Innerhalb der Mutanten mit einer reduzierten Cs-Akkumulation konnten zwei weitere funktionelle Gruppen identifiziert werden. Zum einen wurden nahezu alle Untereinheiten und eine Reihe von Assemblierungsfaktoren der V-ATPase identifiziert und zum anderen zwei Proteinkomplexe, welche in der Proteinsortierung zwischen spätem Golgi-Apparat und Vakuole involviert sind.

In den folgenden Abschnitten werden die hier aufgeführten Proteingruppen näher charakterisiert.

3.7.1 Vps-Mutanten zeigen eine gestörte Sr- und zum Teil auch Cs-Akkumulation

Vps-Mutanten zeigen Defekte in der intrazellulären Proteinsortierung, die zu verschiedenen morphologischen Auffälligkeiten der Vakuole führen. Anhand dieser morphologischen Aspekte wurden die vps-Mutanten in 6 verschiedenen Kategorien eingeteilt (Klasse A bis F) (Bowers & Stevens 2005). In der genomweiten Analyse zur Cs- und Sr-Aufnahme wurden generell Mitglieder der Klassen A, B, D und E identifiziert. Vps-Mutanten der Klasse E zeichnen sich ausschließlich durch eine erhöhte Sr-Anreicherung auf. Ihre Cs-Aufnahme hingegen zeigte keine Auffälligkeiten. Mutanten der Klasse A, B und D hingegen weisen gleichzeitig eine verminderte Cs- und eine erhöhte Sr-Akkumulation auf.

3.7.1.1 Vps-Mutanten der Klasse E

Die betroffenen Proteine sind Bestandteil oder assoziierte Faktoren von vier verschiedenen Transport-Komplexen, ESCRT 0, I, II und III („Endosomal Sorting Complex Required for Transport“), die in der Proteinsortierung am prävakuolären Kompartiment (Abkürzung: PVC, das Äquivalent zum späten Endosom in höheren Eukaryonten) beteiligt sind. In den betreffenden Mutanten ist die Sortierung von Proteinen innerhalb des PVC und deren Austritt aus diesem Kompartiment gestört (Winter & Hauser 2006, Williams & Urbe 2007, Hurley 2008). Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Proteinen, die entweder vom späten Golgi über den klassischen Transportweg oder durch endocytotische Prozesse von der Zelloberfläche in das PVC gelangen und nicht zur Vakuole weitergeleitet werden. Als Folge ist in diesen Hefezellen neben der Vakuole ein abnormal, aufgeblähtes Organell zu beobachten – das so genannte E-Kompartiment.

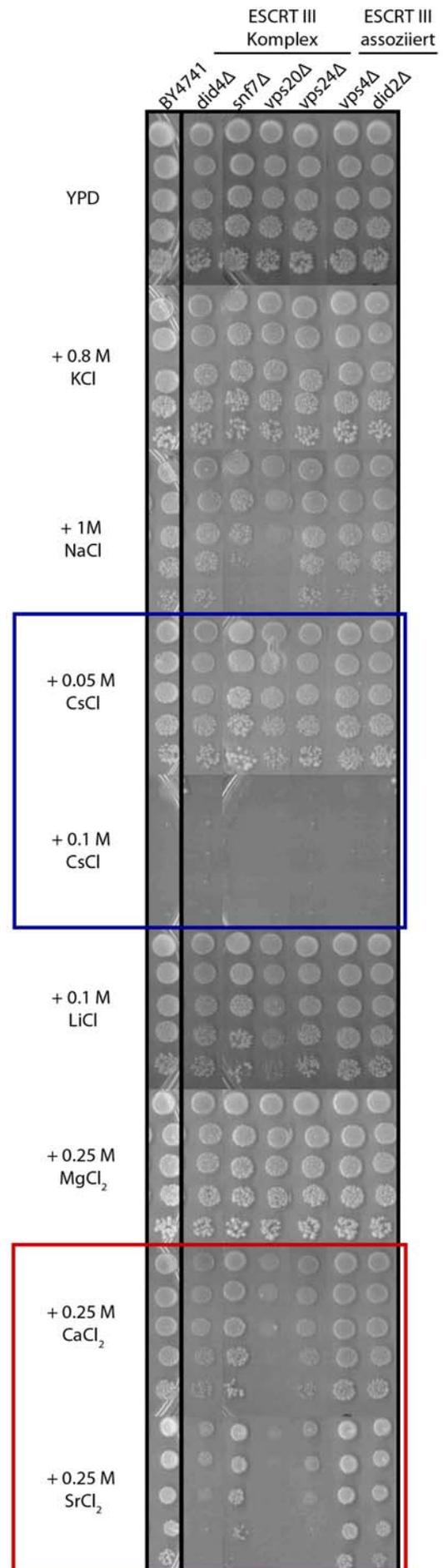
In der folgenden Tabelle 3.5 und Abbildung 3.14 sind die Daten zur Ionen-Anreicherung und -gehalt und das Interaktionsnetzwerk für vps-Mutanten der Klasse E dargestellt.

Abbildung 3.15

Toxizitätstest mit Mutanten der ESCRT III-Untereinheiten

Die Zellen wurden bis zur exponentiellen Phase in YPD herangezogen und 2x mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Resuspension der Zellen zu einer OD von 0.3 wurde eine 5-fache Verdünnungsreihe (1 bis 1:625) auf YPD-Agar mit den entsprechenden Salzen aufgetropft (4 µl/Probe). Nach 48-72 h Inkubation bei 30°C erfolgte die Auswertung.

Die vps-Mutanten *did4Δ*, *snf7Δ*, *vps20Δ* und *vps24Δ* zeigen Sensitivität gegenüber SrCl_2 und in geringerem Umfang auch gegen CaCl_2 . *Snf7Δ* und *vps20Δ* wiesen auch eine schwach ausgeprägte Sensitivität gegenüber 1M NaCl auf.



3.7.1.2 Vps-Mutanten der Klasse A, B und D

Des Weiteren wurde eine Vielzahl von Mutanten in der hier beschriebene Analyse identifiziert, welche den drei anderen vps-Klassen A, B und D angehören (siehe Tabelle 3.6 und Abb. 3.16). Gemeinsam ist diesen Mutanten eine erhöhte Sr-Anreicherung, die überwiegend in Verbindung mit einer reduzierten Cs-Akkumulation auftritt. Diese vps-Mutanten sind zum einen durch eine gestörte Vereerbung von der Vakuole an die Tochterzellen (Klasse A, D) oder durch eine stark fragmentierte Vakuole (Klasse B) charakterisiert (Bowers & Stevens 2005).

Proteine der vps-Klasse D wirken mechanistisch vor denen der Klasse E. So verhindert das Fehlen von Pep12p beispielsweise die Verschmelzung von Transportvesikeln mit dem PVC. Proteine der vps-Klasse B vermitteln den retrograden Transport von Proteinen bzw. Vesikeln vom PVC zum späten Golgi (z.B. Vps17p, Vps54p). Die restlichen Proteine dieser Klasse interagieren mit Faktoren, die in andere Transportschritte oder -routen der intrazellulären Proteinsortierung zwischen spätem Golgi, ER und Vakuole involviert sind (Vps41p, Vam6p, Vam7p).

	Gen	Anreicherung				Gehalt	
		Z _{Cs}	Z _{Sr}	Z _{Sr} (Ca)	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}
VPS B	VPS17	-2,94	3,03	0,82	-0,84	0,54	7,80
	VPS41	-2,34	15,59	10,68	12,61	1,78	3,27
	VAM6	-2,64	14,45	5,49	7,73	0,02	1,77
	VAM7	-4,28	8,48	5,42	6,69	1,56	2,64
	VPS54	-3,84	6,65	3,84	3,07	-2,89	12,42
	VPS72	0,92	3,20	1,87	1,88		
VPS D	PEP12	-3,24	15,80	5,99	3,91	-0,16	13,68
	VPS3	-4,24	11,43	6,09	4,54	-1,51	21,38
VPS A/D	VPS8	-2,06	9,63	8,39	7,22	-0,33	21,55
VPS A	VPS38	-1,82	10,06	7,35	5,66	2,42	3,55
Vesikel-Fusion	VAM3	-2,14	14,19	7,52	9,56	2,81	2,33
	YPT6	-0,67	4,69	1,21	1,15	2,46	21,78
	YPT7	-1,77	12,07	2,88	4,82	0,97	0,11

Tabelle 3.6

Übersicht zu den Mutanten der Klasse A, B und D

Aufgeführt werden die Daten für alle Mutanten, die in Abb. 3.15 im Interaktionsnetzwerk zu finden sind. Aufnahmewerte, die maßgeblich vom Wildtypverhalten abweichen sind in Rot (erhöht) bzw. Grün (vermindert) hervorgehoben. Neben den vps-Mutanten sind drei weitere aufgeführt, die in Vesikelfusionen eine Rolle spielen. Diese Genprodukte stellen Verknüpfungspunkte zu den Kandidaten der vps-Klasse E sowie zu den Proteinen der AP-1- und AP-3-Komplexe dar (siehe 3.7.2).

Mutanten der Klasse B und D zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cs- und Sr-Konzentrationen, wohingegen Vertreter der Klasse A nur gegenüber Sr sensitiv sind (Daten siehe Tabelle 3.4). Gemeinsam ist den hier zusammengefassten vps-Mutanten ein erhöhter, zellulärer Ca-Gehalt.

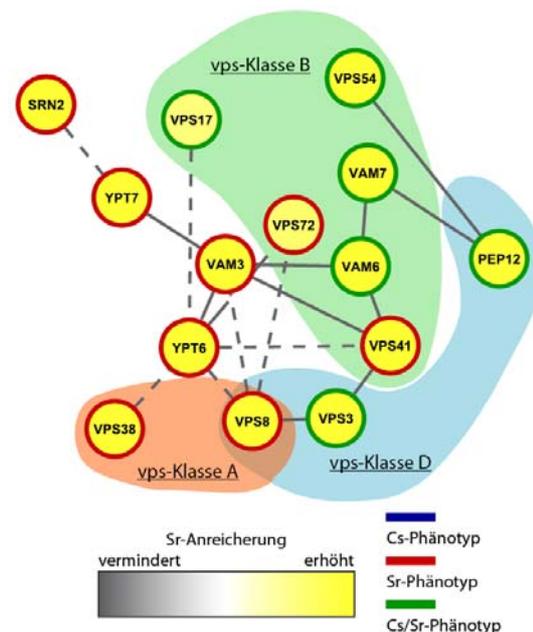


Abbildung 3.16

Interaktionsnetzwerk von Proteinen der vps-Klasse A, B und D

Genetische Interaktionen sind mit gestrichelten Linien dargestellt, physische Interaktionen der Proteine mit durchgehenden. Die genetische Interaktion mit Ypt7 stellt ein Verknüpfungspunkt zu vps-Genen bzw. Proteinen der Klasse E dar. Zwischen den einzelnen Klassen kommt es außerdem zu einer Überschneidung (VPS8).

3.7.2 Störungen in der intrazellulären Proteinsortierung beeinflussen die Cs- Anreicherung

Die zweite funktionelle Gruppe von Mutanten mit verminderter Cs-Anreicherung zeigte Defekte in der Proteinsortierung vom späten Golgi-Apparat (Äquivalent zu Trans-Golgi-Netzwerk in höheren Eukaryoten) zur Vakuole. Die betroffenen Proteine sind Bestandteile von zwei Adapter-Komplexen, die Zielproteine im späten Golgi erkennen und daraufhin die Rekrutierung von Hüllproteinen vermitteln. Sie unterstützen auf diese Weise die Bildung von Transportvesikeln (siehe Tabelle 3.7 und Abbildung 3.17).

	Gen	Anreicherung				Gehalt	
		Z _{Cs}	Z _{Sr}	Z _{Sr (Ca)}	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}
AP-3 Komplex	APS1	-3,74	1,59	1,41	2,19	-3,78	-0,85
	APM1	-4,81	0,26	3,42	2,27	-1,76	-0,46
	APM2	2,49	1,01				
	APL2	-4,73	3,25	1,19	1,16	1,95	3,04
AP-3 Komplex	APL4	-3,66	2,36	1,60	1,75	0,42	1,45
	APS3	-3,32	-0,77	-3,10	-3,68	1,74	-0,31
	APM3	-2,10	-1,41				
	APL5	-3,44	-1,67	-3,11	-3,76	-2,03	-2,91
Vesikel-fusion	APL6	-3,03	-0,79	-1,50	-2,55	0,27	-1,77
	VAM3	-2,14	14,19	7,52	9,56	2,81	2,33
	VAM6	-2,64	14,45	5,49	7,73	0,02	1,77
	VAM7	-4,28	8,48	5,42	6,69	1,56	2,64
	PEP12	-3,24	15,80	5,99	3,91	-0,16	13,68

Tabelle 3.7

Zusammenfassung der AP-1 und AP-3-Komplexe und assoziierter Faktoren

Aufgeführt werden die Daten für alle Mutanten, die im nebenstehenden Interaktionsnetzwerk dargestellt werden und einem der drei Cluster angehören. Rot und Grün hervorgehobene Werte kennzeichnen Mutanten, deren Anreicherungsverhalten für Cs, Sr und/oder Ca bzw. deren Ionengehalt signifikant vom Wildtyp abweichen.

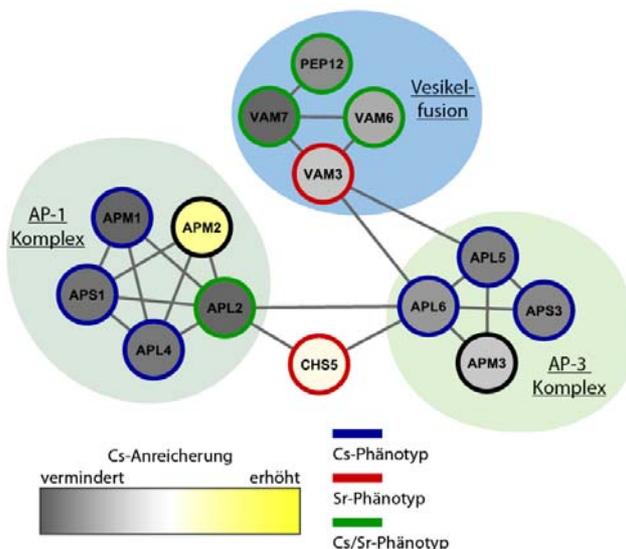
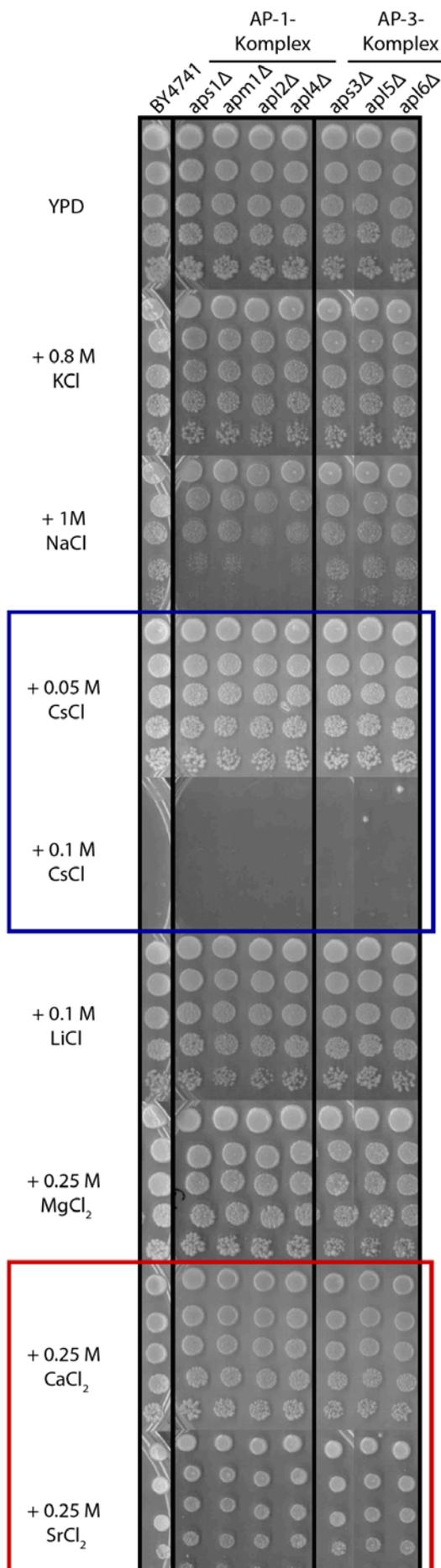


Abbildung 3.17

Interaktionsnetzwerk der beiden AP-Komplexe

Klar differenziert sind 2 Komplexe, AP-1 und AP-3, die über jeweils eine ihrer Untereinheiten (Apl2p und Apl6p) miteinander interagieren. CHS5 stellt einen weiteren Verbindungspunkt zwischen beiden Komplexen dar und hat selbst Funktionen in der Sekretion von Proteinen. Ebenfalls angegeben ist eine dritte Gruppe von Proteinen, die für Vesikel- bzw. Membranfusionsprozesse benötigt werden. Vam3p stellt dabei eines der Zielproteine dar, die durch den AP-3-vermittelten Proteintransport zur Vakuole gelangen.

Die hier identifizierten Proteine gehören zu den Komplexen AP-1 und AP-3. Beide sind an der Vesikelformierung am späten Golgi beteiligt, wobei sie zwei verschiedenen Transportwegen zuzuordnen sind. Der AP-1-Komplex vermittelt den Vesikeltransport über die „klassische“ Route zur Vakuole, die über endosomale Zwischenkompartimente verläuft und in der Regel durch Clathrin-umhüllten Vesikeln vermittelt wird (CPY-Route). Für den Adaptor-Komplex AP-3 hingegen wurde gezeigt, dass dieser in einem alternativen Transportweg eine Rolle spielt, der direkt vom späten Golgi zur Vakuole verläuft und Clathrin-unabhängig erfolgt (ALP-Transportweg). Bei den einzigen beiden Proteinen, die nach heutigem Stand über diesen alternativen Transportweg zur Vakuole gelangen, handelt es sich um Pho8p (= ALP, alkalische Phosphatase) und Vam3p, ein Syntaxin-Homolog.



Vam3p wiederum ist an zeitlich später ablaufenden Schritten der Proteinsortierung beteiligt als die AP-1- und AP-3-Komplexe und interagiert mit Vam6p und Vam7p (welches ebenfalls Pep12p bindet).

Allen Proteinen ist eine Funktion bei der Fusion von Vesikeln mit deren jeweiligen Zielmembranen (z.B. der Membran der Vakuole oder des Endosoms) gemeinsam. Die entsprechenden Mutanten zeigen einen vergleichbaren Phänotyp. Sie reichern weniger Cs an als der Wildtyp, zeigten aber gleichzeitig eine stark erhöhte Sr-Akkumulation.

Die Kandidatenstämme für den AP-3-Komplex zeigen zusätzlich zu ihrer verminderten Cs-Anreicherung auch eine reduzierte Ca- und Sr-Akkumulation (Tabelle 3.7). Gegenüber verschiedenen mono- und divalenten Kationen zeigen die Mutanten keine Sensitivität (Abbildung 3.18). In der Gruppe der Mutanten für die Untereinheiten von AP-1 wurde eine leicht ausgeprägte Sensitivität gegenüber 1M NaCl beobachtet.

Abbildung 3.18
Toxizitätstest der Mutanten für Untereinheiten der AP-Komplexe

Die Zellen wurden wie in Abb. 3.14 beschrieben vorbereitet und auf YPD-Agar mit den entsprechenden Salzen aufgetropft (4 µl/Probe, 5 Verdünnungsstufen).

Nach 48-72 h Inkubation bei 30°C erfolgte die Auswertung. Alle Mutanten zeigen relativ ähnliche Wachstumseigenschaften wie der Wildtyp. Auffällig ist ein leicht eingeschränktes Wachstum von Mutanten der AP1-Untereinheiten auf 1 M NaCl.

3.7.3 Die V-ATPase beeinflusst die Anreicherung von Cs maßgeblich

V-ATPasen sind Protonenpumpen in intrazellulären Membransystemen, die erstmals an Vakuolen beschrieben wurden. Die V-ATPase ist ein Multimer, das in zwei große Untereinheiten gegliedert ist – V_0 (membranständig) und V_1 (löslich). Die Funktion der V-ATPase ist der Transport von Protonen unter Energieverbrauch aus dem Cytosol in verschiedene intrazelluläre Kompartimente, wie zum Beispiel der Vakuole oder dem Golgi-Apparat.

In der Tabelle 3.8 sind alle in der Literatur beschriebenen Untereinheiten der V-ATPase aufgelistet (von (Forgac 1998)). Für drei der Untereinheiten konnten keine Daten zur Cs- und Sr-Aufnahme erhoben werden, da die Mutanten nicht auswertbar waren oder in der Kollektion fehlten. Alle Mutanten von V-ATPase-Untereinheiten (vma-Mutanten), die in dieser Analyse identifiziert wurden, zeigen eine vergleichbare Verminderung in der Cs-Anreicherung. $Vma6\Delta$ und $vma7\Delta$ zeigen ebenfalls eine verminderte Cs-Aufnahme, die aber nicht den Auswahlkriterien entsprach (siehe Abschnitt 3.3). Sie sind in Tabelle 3.8 grau dargestellt. Neben den Untereinheiten der V-ATPase konnten auch vier Mutanten für Assemblierungsfaktoren der V-ATPase identifiziert werden ($vma21\Delta$, $vma22\Delta$, $vph2\Delta$ und $rav1\Delta$), die einen vergleichbaren Cs-Phänotyp wie die vma-Mutanten aufwiesen.

Die V-ATPase tritt in zwei verschiedenen Formen auf, bei der jeweils eine bestimmte Isoform der α -Untereinheit enthalten ist, Vph1p oder Stv1p. Vph1p ist in der vakuolären V-ATPase zu finden wohingegen Stv1p in Protonenpumpen des Endosoms und Golgi-Apparates vorkommt. Eine Einschränkung der vakuolären V-ATPase-Aktivität durch das Fehlen von Vph1p reduziert die Cs-Anreicherung weniger deutlich als es bei einer Deletion für die anderen Kandidatenproteine beobachtet werden konnte, welche bei beiden V-ATPase-Typen vorkommen. Die Speicherfunktion der Vakuole scheint demnach nicht alleine Ausschlag gebend zu sein. Eher lässt sich schlussfolgern, dass die Rolle der V-ATPase bei der Ansäuerung verschiedener Organellen, die für eine korrekte Proteinsortierung essentiell ist, ebenso großen Einfluss hat wie die Speicherfunktion der Vakuole.

Ein wesentliches Charakteristikum der vma-Mutanten ist die Sensitivität gegenüber alkalischen pH-Bedingungen ($\text{pH} > 7$) und hohen Ca-Konzentrationen des Mediums. Erwartungsgemäß wachsen die meisten Mutanten nicht auf YPD-Medium, dem 250 mM CaCl_2 zugesetzt wurde (Abbildung 3.20). Ausnahme bilden die beiden Mutanten für STV1 und VPH1 sowie der α -Untereinheit TFP1. Die gleiche wachstumshemmenden Effekte können bei 250 mM SrCl_2 beobachtet werden. Weiterhin sind die vma-Mutanten mehrheitlich sensitiv gegenüber hohen K- und Na-Konzentrationen. In Bezug auf Cs kann hingegen eine höhere Resistenz gegenüber 100 mM CsCl als beim Wildtyp BY4741 gemessen werden. Erstaunlicherweise zeigten gerade die drei Mutanten, die keine Ca-Sensitivität aufwiesen ($stv1\Delta$, $vph1\Delta$ und $tfp1\Delta$) keine Resistenz gegenüber hohen Cs-Konzentrationen, obwohl auch diese Mutanten sehr wenig Cs anreicherten.

Somit weisen die vma-Mutanten im Allgemeinen eine hohe Sensitivität gegenüber Ca und Sr auf. Gleichzeitig zeichnen sie sich durch eine dramatisch eingeschränkte Cs-Aufnahme aus, die mit einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Ion gekoppelt ist.

	Unter-einheit	Gen	Anreicherung				Gehalt	
			Z _{Cs}	Z _{Sr}	Z _{Sr} (Ca)	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}
V ₁ -Untereinheiten	A	TPF1	-6.51	2.36	-0.46	-0.54	-4.13	1.13
	B	VMA2	-6.54	1.32	-1.61	-1.48	7.90	-9.57
	C	VMA5	-6.45	1.47	-2.24	-2.61	7.32	-7.59
	D	VMA8	-6.53	2.16	-1.93	-2.79	7.81	-2.43
	E	VMA4	-6.49	2.08	-1.48	-2.05	6.76	-5.12
	F	VMA7	-1.60	-2.49				
	G	VMA10	keine Messdaten					
	H	VMA13	keine Messdaten					
V ₀ -Untereinheiten	a	VHP1	-2.57	4.22	-0.29	-0.31	2.39	-8.12
	a	STV1	-5.00	1.42	2.05	1.99	4.08	3.22
	c	CUP5	-6.27	0.32	-1.83	-3.11	6.68	-3.36
	c'	TFP3	-6.41	1.80	-1.69	-2.41	5.19	-5.50
	c''	PPA1	-5.36	3.32	-2.02	-2.63	7.32	-8.42
	d	VMA6	-2.03	-1.70				
Assemblierungs-faktoren	e	VMA9	nicht in der Kollektion enthalten					
	ER Faktoren	VPH2	-6.52	1.95	-2.99	-3.37	7.13	-13.71
		VMA21	-4.97	3.64	-1.69	-2.49	-1.86	-6.15
		VMA22	-6.53	2.07	-2.53	-2.00	9.28	-5.50
	RAVE-Komplex	RAV1	-3.61	17.87	5.47	6.44	2.75	1.15
		RAV2	-1.83	4.77	1.63	1.68	3.32	4.34

ER = Endoplasmatisches Retikulum
 RAVE = "Regulator of the H⁺-ATPase of the Vacuolar and Endosomal membranes"

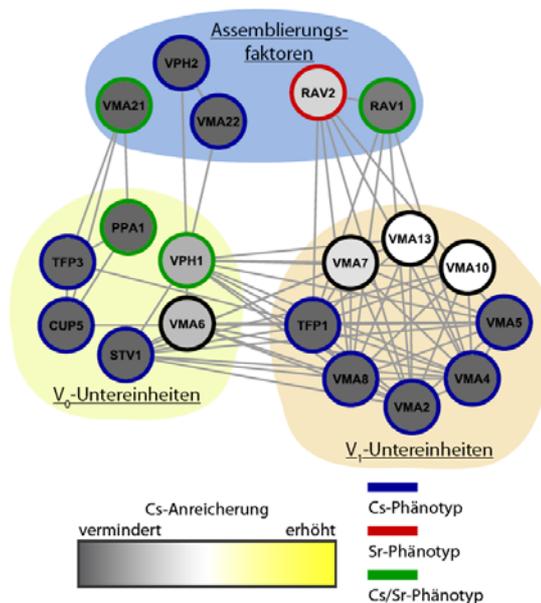


Tabelle 3.8
vma-Mutanten und der Mutanten für die Assemblierungsfaktoren

Angegeben sind jeweils die Z-Scores für die Anreicherung oder Gehalt der angezeigten Ionen. Werte, die signifikant von den Wildtyp abweichen sind rot (erhöht) und grün (vermindert) dargestellt.

Die Assemblierungsfaktoren teilen sich ein in ER-Faktoren, die notwendig sind für die korrekte Zusammenstellung der V-ATPase im ER, sowie in Bestandteile des RAVE-Komplexes. Der RAVE-Komplex vermittelt die reversible Assemblierung bzw. Disassemblierung der V₁- und V₀-Untereinheit und hat somit regulatorische Funktionen.

Abbildung 3.19
Interaktionsnetzwerk der vma-Mutanten

Interaktionsnetzwerk aller identifizierten Genprodukte, deren Deletion eine erniedrigte Cs-Anreicherung zur Folge hat. Gezeigt werden nur physische Interaktionen zwischen den Proteinen. Die Analyse wurde mit Cytoscape 2.6 durchgeführt. Die V₁- und V₀-Untereinheit interagieren über eine Vielzahl von Faktoren miteinander. Die Assemblierungsfaktoren des ER (Vma21/22p und Vph2p) interagieren ausschließlich mit der V₀-Untereinheit, wohingegen die Bestandteile des RAVE-Komplexes (Rav1/2p) an die V₁-Untereinheit binden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Teil der Mutanten dieses funktionellen Clusters eine verminderte Ca-Aufnahme und auch einen reduzierten Ca-Gehalt aufweisen (Tabelle 3.8). Die Ursache liegt wahrscheinlich an der funktionellen Einschränkung der Vakuole, die das primäre Ca-Reservoir in der Zelle darstellt und auch eine zentrale Rolle in der Ca-Homöostase spielt. Die Sr-Aufnahme der Mutanten zeigte unterschiedliche Ergebnisse, auf die bereits in Abschnitt 3.5.3 eingegangen wurde. In den initialen Analysen konnte fast durchweg eine leicht erhöhte Sr-Anreicherung gemessen werden. In späteren Experimenten mit Ca und Sr zeigte sich hingegen das gleiche Aufnahmeverhalten wie für Ca, also eine leicht verminderte Sr-Aufnahme. In beiden Fällen liegt die Sr-Anreicherung jedoch innerhalb der festgelegten Auswahlgrenzen (-2,5 < Z-Score < 2,5) und entspricht somit Wildtyp-Niveau. Gleichzeitig ist der K-Gehalt der meisten Mutanten deutlich erhöht.

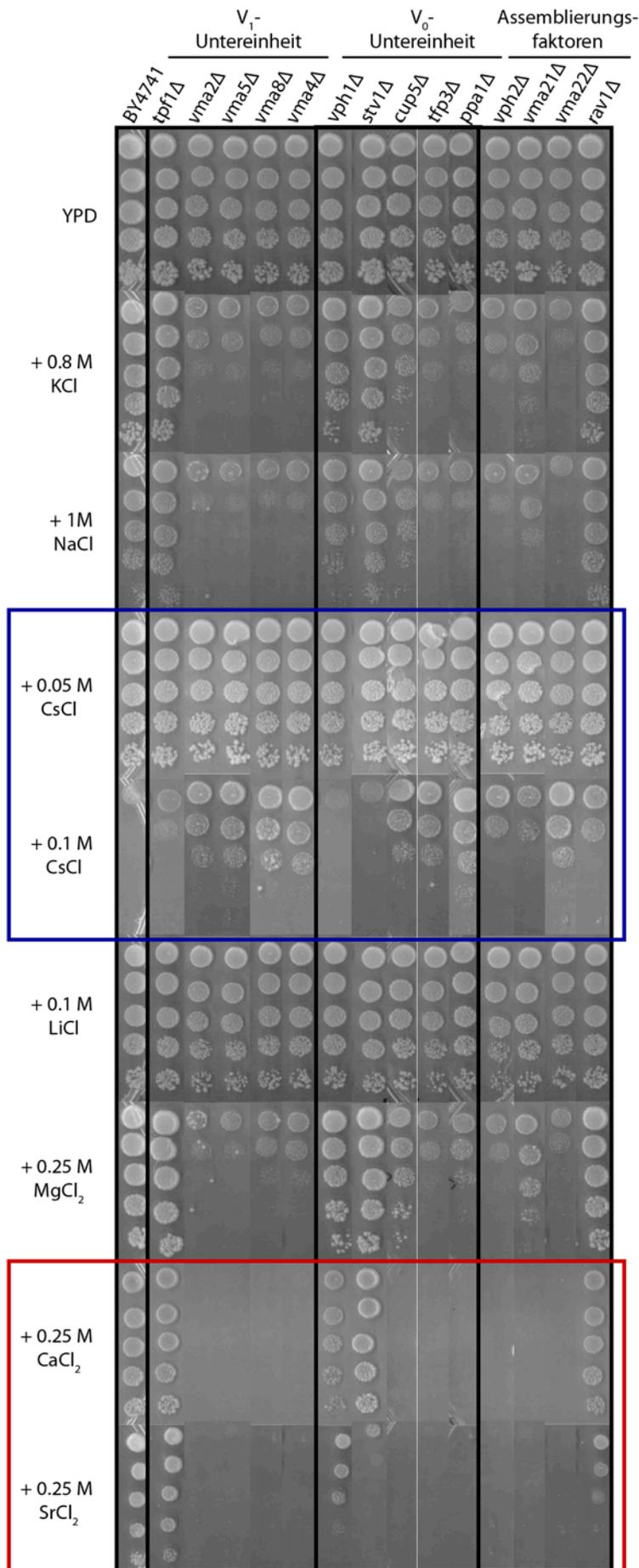


Abbildung 3.20

Toxizitätstest für die *vma*-Mutanten

Der hier dargestellte Toxizitätstest wurde analog zu den vorhergehenden durchgeführt. Die *vma*-Mutanten weisen mehrheitlich eine Sensitivität gegenüber Ca und Sr auf. Im Gegensatz zum Wildtyp wachsen sie aber besser auf YPD-Medium mit 100 mM CsCl.

3.8 Transportproteine, die die Anreicherung von Cs und Sr beeinflussen

Wie im Abschnitt 3.6 erwähnt, wurde anhand der genomweiten Analyse nur eine geringe Anzahl von Transportproteinen identifiziert. Diese könnten direkt an der Aufnahme von Cs bzw. Sr beteiligt sein, wohingegen alle bisher beschriebenen Genprodukte eher einen indirekten Effekt haben. In der folgenden Tabelle sind alle Transportproteine zusammengefasst und auch Proteine mit unbekannter Funktion, die jedoch Homologien zu Transportern aufweisen.

Gen	Anreicherung					Gehalt	
	Z _{Cs}	Z _{Sr}	Z _{Rb}	Z _{Sr} (Ca)	Z _{Ca}	Z _K	Z _{Ca}
KHA1	-2,78	1,31	-0,31	2,09	0,97	-0,25	5,20
FCY2	-2,71	-1,39	-0,85	0,66	0,86	-3,10	1,88
FPS1	3,97	-0,11	0,33	-1,01	-1,02	0,05	1,25
YDR090C	5,36	-0,58	0,37	-0,13	-0,04	1,61	3,68
GEF1	-4,18	3,08	-1,11	3,67	4,07	0,10	4,15
TPO1	2,57	-2,59	0,34	-0,84	-1,32	-1,17	5,95
PMP3	4,18	7,08	-1,00	1,91	1,66	-0,25	13,38
TRK1	4,69	14,89	0,09	3,12	2,85	-2,72	3,10
NHX1	-2,41	4,79	-3,01	6,51	4,78	1,54	8,43
MCH5	-2,35	18,96	-1,98	10,73	8,87		
SPF1	-0,96	8,12	0,30	6,27	6,01		
YGR125W	-0,12	-3,35	1,30	-2,82	-3,40	3,13	4,51
PMC1	0,18	-5,03	-0,12	-3,84	-4,37	0,81	-8,21
NHA1	2,00	-3,25	-0,37	-3,22	-3,64	-1,61	6,06

Tabelle 3.9

Transportproteine, die mit der Cs/Sr-Anreicherung assoziiert sind

Aufnahmewerte, die maßgeblich vom Wildtypverhalten abweichen sind in rot (erhöht) bzw. grün (vermindert) hervorgehoben.

Nachfolgend werden die in der Tabelle 3.9 aufgelisteten Transportproteine vorgestellt, eingeteilt nach dem Phänotyp ihrer jeweiligen Mutanten:

- i) Mutanten mit veränderter Cs-Anreicherung konnten lediglich in vier Fällen mit direkten Transportprozessen assoziiert werden. Der Verlust der Transporter Kha1p und Fcy2p führt zu einer Verminderung der Cs-Anreicherung. Kha1p ist ein putativer K/H-Antiporter, der in der zellulären Kationhomöostase mitwirkt. Möglicherweise transportiert Kha1p Cs in verschiedene intrazelluläre Kompartimente. Ein Fehlen des Transporters könnte dazu führen, dass mehr Cs aus der Zelle hinaus transportiert wird weil es nicht in intrazelluläre Kompartimente gelangt. Das trägt unter Umständen zu einer Senkung des totalen Cs-Gehalt bei. Fcy2p ist eine Purin/Cytosin-Permease in der Plasmamembran. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp ist ein Symport von Cs mit dem eigentlichen Transportgut. Somit würde das Fehlen der Permease zu einer verminderten Cs-Aufnahme führen.
Die Deletion von Fps1p und Ydr090cp hingegen vermittelt eine verstärkte Anreicherung von Cs in den Hefezellen. Bei Fps1p handelt es sich um einen Kanal in der Plasmamembran, der die Abgabe von Glycerin und die Aufnahme von Essigsäure und trivalente Metalloiden vermittelt. Ydr090cp ist ein Protein unbekannter Funktion mit Homologie zum Cystinosin, einem humanen Cystin-Transporter. Möglich wäre eine aktive Rolle von beiden Transportproteinen bei der Ausschleusung von Cs aus der Zelle. Beide Mutanten, ydr090cΔ und fps1Δ, zeigen eine geringfügige Sensitivität gegenüber hohen Cs-Konzentrationen im Medium.
- ii) Mutanten mit veränderter Sr-Anreicherung: In dieser Kandidatengruppe können jeweils drei Mutanten mit einer verminderten und mit einer verstärkten Anreicherung von Sr assoziiert werden. Eine Verminderung der Sr-Anreicherung zeigen pmc1Δ, nha1Δ und

ygr125w Δ . Pmc1p ist eine Ca-ATPase in der Vakuole, welche für die Regulation der Ca-Aufnahme verantwortlich ist. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass pmc1 Δ -Zellen einen bis zu 80 % reduzierten Ca-Gehalt in der Vakuole aufweist (Cunningham & Fink 1994b). Vergleichbare Werte konnten in dieser Arbeit auch für Sr ermittelt werden: pmc1 Δ zeigt eine Reduktion der Sr-Anreicherung auf 22 % des Wildtyps. Nha1p ist ein Kationen-Transporter, der keine Affinität für Ca sondern vielmehr für Na und K besitzt. Die Ursachen, die zu einem eingeschränkten Ca- bzw. Sr-Anreicherung beim Fehlen von Nha1p führen, sind bisher nicht bekannt. Der letzte Vertreter dieser Gruppe, Ygr125wp, ist ein noch nicht charakterisiertes Protein unbekannter Funktion. Es zeigt Homologien zu Sulfattransportern in anderen Hefen und *Arabidopsis thaliana*, was eine Verbindung zu divalenten Kationen erklären könnte.

Die Deletion von Mch5p, Spf1p und Nhx1p führt zu einer stark erhöhten Sr-Anreicherung. Mch5p ist ein Riboflavintransporter in der Plasmamembran. Spf1 ist eine putative Ca-ATPase, die in die Ca-Homöostase involviert ist. Nhx1 Δ ist ein Kationen-Antiporter des Endomembransystems. Nhx1 Δ wird aber gleichzeitig den vps-Mutanten der Klasse E zugeordnet und zeigt die gleichen Eigenschaften wie die restlichen Mitglieder dieser Klasse. Die vermehrte Sr-Aufnahme hat demnach wahrscheinlich eher mit einer defekten Proteinsortierung zu tun.

- iii) Mutanten mit veränderter Cs- und Sr-Anreicherung: Diese Gruppe wird von vier Transportern repräsentiert: Trk1p, Pmp3p, Gef1p und Tpo1p. Das Fehlen von Trk1p oder Pmp3p führt zu einer dramatisch erhöhten Anreicherung von Cs und Sr. Die beiden korrespondierenden Mutanten sind sensitiv gegenüber einer breiten Palette von mono- und divalenter Kationen (K, Na, Cs, Li, NH₄⁺, Ca und Sr, siehe Anhang 2). Für beide Mutanten wurde außerdem berichtet, dass sie durch eine hyperpolarisierte Plasmamembran ausgezeichnet sind, wodurch unspezifisch wirkende Kationen-Transporter bzw. -Kanäle aktiviert werden und zu einer unkontrollierten Aufnahme von Ionen beitragen (Madrid et al. 1998, Navarre & Goffeau 2000).

Weiterhin kann gef1 Δ mit einer verminderten Cs-Anreicherung und erhöhter Sr-Anreicherung assoziiert werden. Gef1p ist ein spannungsabhängiger Chloridkanal, der sowohl im gesamten Endomembransystem, in der Vakuole als auch in der Plasmamembran gefunden wurde. Das Fehlen von Gef1p verhindert den Transport von Anionen in intrazelluläre Kompartimente, was zur Erhaltung der Elektroneutralität beiträgt. Diese Elektroneutralität ist essentiell die für die Aufnahme von Kationen in intrazelluläre Kompartimente (Gaxiola et al. 2002). Gef1 Δ ist sensitiv gegenüber Cs, Sr und Ca.

Des Weiteren führt die Deletion von Tpo1p, einem Polyamintransporter, zu erhöhter Cs- und verminderter Sr-Anreicherung. Denkbar wäre hier ein gleichzeitiger Transport von Polyaminen und anderen Kationen wie Ca und Sr, der in der Mutante unterbunden ist. Gleichzeitig ist es möglich, dass der Polyaminspiegel der Zelle einen Einfluss auf die Ionenhomöostase hat.

3.9 YDR090C – Portrait eines Kandidaten

Eine kleinere Anzahl von Mutantenstämmen, die in der genomweiten Untersuchung identifiziert werden konnten, wurde mittels Sequenzierung der spezifischen Tags (siehe 2.1.8) verifiziert (unter anderem *kha1Δ*, *trk1Δ*, *fcy2Δ*, *mch5Δ*, *pmp3Δ*, *nha1Δ*, *nhx1Δ*, *tpo1Δ*, *ypk1Δ*, *ygr125wΔ*, *ydr089wΔ*). Anschließend wurden diesen Mutanten mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden näher charakterisiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Mutantenstamm *ydr090cΔ* herausgegriffen und die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen mit der Mutante in diesem Kapitel zusammengefasst.

Der ORF YDR090C codiert für ein putatives Protein unbekannter Funktion. Die einzigen Anhaltspunkte zur Funktion konnten anhand der Homologie zu anderen Proteinen erhalten werden. Für das Protein wurden 6 Transmembran-Domänen vorhergesagt. Des Weiteren konnten zwei Domänen im Protein identifiziert werden, bei denen es sich um so genannte PQ-loops handelt, die ebenfalls in Cystinosin (*H. sapiens*) und Ers1p (*S.cerevisiae*) vorkommen. Diese Proteine sind H⁺-getriebene Cystin-Transporter, deren Substrat ein Disulfid des Cysteins ist - das Cystin. Es ist also denkbar, dass es sich bei Ydr090cp um einen membranständigen Transporter handelt.

3.9.1 Die Cs-Anreicherung in *ydr090cΔ*

Ydr090cΔ-Zellen weisen eine stark erhöhte Anreicherung von Cs auf, die Sr-Akkumulation hingegen entspricht Wildtyp-Niveau. Vergleicht man die Cs-Anreicherung zwischen Wildtyp BY4741 und *ydr090cΔ*, so ist deutlich zu erkennen, dass die initiale Aufnahmekurve bei der Mutante steiler verläuft (Abb. 3.21). Gleichzeitig erreicht die Cs-Anreicherung in *ydr090cΔ* erst zu viel später eine Sättigung, da auch die K_d -Werte große Unterschiede aufweisen (Vergleich $K_{d, WT} \sim 29$ min und $K_{d, ydr090c\Delta} \sim 120$ min).

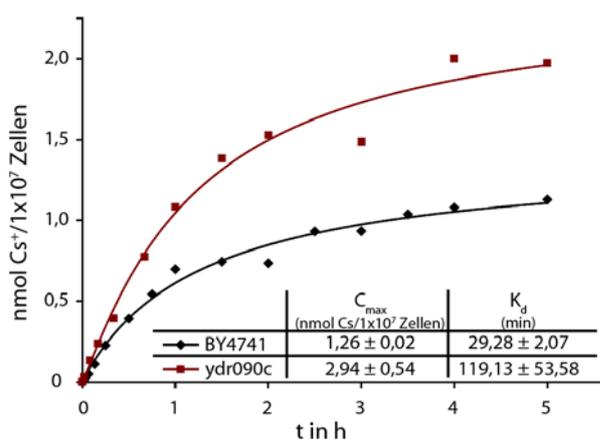


Abbildung 3.21

***ydr090cΔ* zeigt eine erhöhte Cs-Anreicherung**

Vergleichend dargestellt ist die Cs-Aufnahme vom Wildtyp BY4741 (WT) und *ydr090cΔ* über einen Zeitraum von 5 h bei einer externen Cs-Konzentration von 0,05 mM. Die Mutante *ydr090cΔ* reichert in dieser Zeit mehr als doppelt soviel Cs an als der Wildtyp. Gleichzeitig erreicht die Cs-Anreicherung in der Mutante erst viel später eine Sättigung als es beim Wildtyp zu beobachten ist (Vergleich $K_{d, WT} \sim 29$ min und $K_{d, ydr090c\Delta} \sim 120$ min). Dargestellt ist eine repräsentative Messung. Zwischen den einzelnen Messungen betrug die Standardabweichung bis zu 25%.

Die Cs-Anreicherung in *ydr090cΔ* wird durch die Präsenz weiterer mono- und divalenter Kationen beeinflusst. In Abbildung 3.22 ist die Cs-Anreicherung bei einer externen Konzentration von 0,05 mM CsCl in Abhängigkeit der K- und Ca-Konzentration dargestellt. Zu beobachten ist eine ähnliche Verminderung der Cs-Anreicherung um etwa 50-60 % in den Mutanten- und Wildtypzellen durch eine

Erhöhung der K-Konzentration von 0 auf 10 mM, wobei die Reduktion oder Cs Anreicherung in Mutanten und WT Zellen nahezu parallel verläuft (siehe Abb. 3.22).

Die Zugabe von Ca reduziert die Anreicherung von Cs in *ydr090cΔ* Zellen um fast 75 % (WT: 65 %), was dazu führt, dass in Wildtyp und *ydr090cΔ* Zellen ein beinahe identischen, absoluten Cs-Gehalt vorliegt. Die Kurven der Cs Anreicherung zwischen WT und Mutante unterscheiden sich für diese Messung dramatisch, wobei die Mutante durch einen sehr starken Abfall in der intrazellulären Cs Konzentration gekennzeichnet ist. Durch Ca werden nichtselektive Aufnahmemechanismen der Zelle inhibiert (Madrid et al. 1998). Anzunehmen ist, dass die verbleibende Cs-Akkumulation durch den Einstrom des Ions über die primären K-Transporter Trk1/2p oder Ca-insensitive Transportproteine vermittelt wird.

Aus Vergleichsgründen wurden zwei weitere Mutanten mit einer veränderten Cs-Anreicherung untersucht, die beide Funktionen in der K-Homöostase der Zelle besitzen: *trk1Δ*-Zellen sind defizient für die hochaffine K-Aufnahme und *kha1Δ*-Zellen fehlt ein putativer K-Transporter, der in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist. *Trk1Δ*-Zellen zeichnet sich durch eine stark erhöhte Cs-Anreicherung auf wie es auch für *ydr090cΔ* der Fall ist. Der Einfluss von K auf die Cs-Anreicherung ist vergleichbar mit *ydr090cΔ* und dem Wildtyp (Reduktion der Cs-Akkumulation um ca. 60 %). Steigende Ca-Konzentrationen hingegen vermögen die Cs-Akkkumulation nicht so drastisch zu senken wie bei den anderen untersuchten Hefestämmen (Reduktion um 30 %). Demnach scheinen die Mechanismen, die zu einer erhöhten Cs-Anreicherung in beiden Mutantenstämmen (*trk1Δ* und *ydr090cΔ*) führen, verschieden zu sein. *Kha1Δ*-Zellen zeichnen sich durch eine zum WT deutlich reduzierte Cs-Akkumulation aus. Weder zugesetztes K noch Ca (jeweils bis zu 10 mM) bedingen eine Reduktion der Cs-Anreicherung.

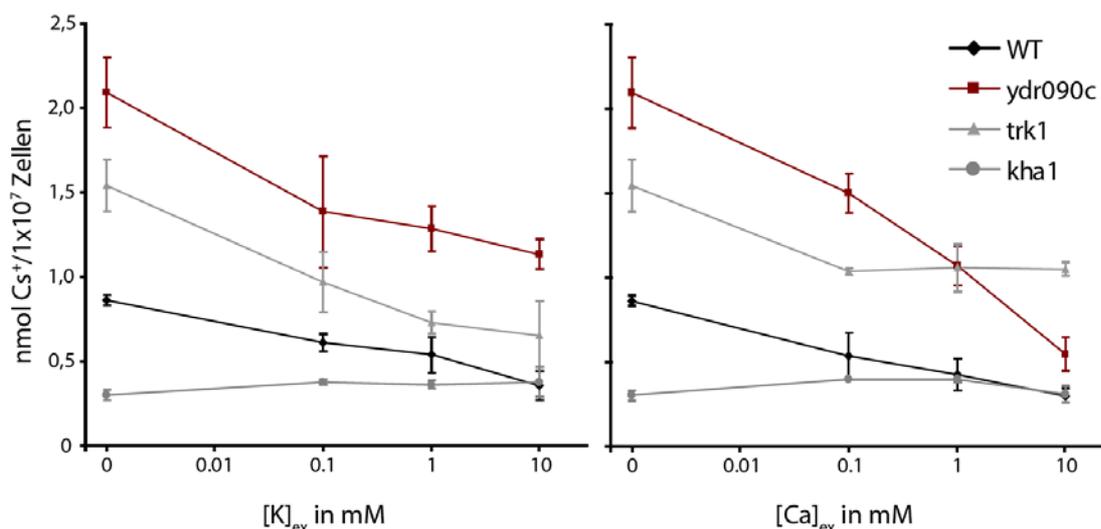


Abbildung 3.22

Der Einfluss von K und Ca auf die Cs-Anreicherung

Dargestellt ist die Cs-Anreicherung für den Wildtyp und drei Mutanten, die einen Cs-Phänotyp aufweisen: *ydr090cΔ* und *trk1Δ* mit einer erhöhten Cs-Anreicherung und *kha1Δ* mit einer verminderten. K und Ca haben keinen Effekt auf die Cs-Akkumulation von *kha1Δ*. *Ydr090cΔ*, *trk1Δ* und der Wildtyp BY4741 zeigen eine ähnliche Verminderung der Cs-Akkumulation bei steigenden K-Konzentrationen (um 50-60 %). 10 mM CaCl₂ im Assay-Puffer zeigen hingegen eine drastische Reduktion der Cs-Akkumulation in *ydr090cΔ* (um 75 %).

3.9.2 YDR090C wird transkribiert

Um zu testen, ob der ORF YDR090C transkribiert wird, wurden *Northern Blot*-Experimente mit dem Wildtyp BY4741 und *ydr090cΔ* durchgeführt, die wie für den genomweiten Aufnahme-Versuch kultiviert und wahlweise in An- oder Abwesenheit von Cs inkubiert wurden. Die isolierte RNAs aus beiden Stämmen wurde isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einer spezifischen Sonde für YDR090C untersucht.

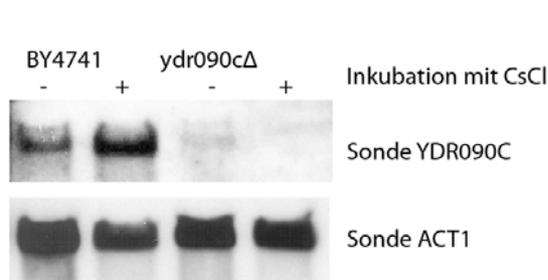


Abbildung 3.23

Expression von YDR090C in BY4741

Die Hefezellen wurden analog zu den Aufnahmeversuchen herangezogen und anschließend für 2 h in Assay-Puffer mit oder ohne CsCl (+/-) inkubiert. Im Wildtyp konnte eine mRNA-Spezies mit der YDR090C-Sonde nachgewiesen werden, in der Mutante *ydr090cΔ* erwartungsgemäß nicht. Durch Zugabe von CsCl wurde zusätzlich eine deutliche erhöhte Transkription für YDR090C im Wildtyp festgestellt.

In Abbildung 3.23 ist ein *Northern Blot* für den Wildtyp und die Mutante *ydr090cΔ* dargestellt. Beim Wildtyp kann mithilfe der YDR090C-Sonde zweifelsfrei eine RNA-Spezies nachgewiesen werden, die eine Länge von ca. 1200 Basen aufwies. Der kodierende Bereich des ORF YDR090C weist eine Länge von 933 bp auf. Somit ist die identifizierte mRNA von YDR090C länger als der kodierende Bereich, was durch Poly-Adenylierung oder anderen RNA-Modifizierungen erklärt werden könnte. Innerhalb der Region, die die Sonde flankiert, lässt sich kein weiterer ORF mit einer Länge von 1200 Basen identifizieren. In der Negativkontrolle (*ydr090cΔ*) konnte keine mRNA-Spezies mit der YDR090C-Sonde nachgewiesen werden. Das Experiment belegt folglich, dass das nicht charakterisierte Gen YDR090C tatsächlich transkribiert wird, und der ORF in *ydr090cΔ*-Zellen nicht mehr funktionsfähig ist. Weiterhin kann durch die Inkubation mit Cs eine Verstärkung der Bande für YDR090C-mRNA nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Transkription von YDR090C in der Anwesenheit von Cs induziert wird. Als Ladekontrolle wurde ACT1 verwendet. Die ACT1-mRNA ist bei allen vier Proben (+ oder - CsCl) in vergleichbaren Mengen nachweisbar.

3.9.3 Die Komplementation der Mutante *ydr090cΔ* unterdrückt den Cs-Phänotyp

Eine weitere Analyse mit *ydr090cΔ* brachte hervor, dass die Mutante sensitiv gegenüber hohen Cs-Konzentrationen im Medium ist (siehe Abb. 3.24), sich bei allen anderen getesteten Kationen (K^+ , Na^+ , Rb^+ , Li^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}) aber wie der Wildtyp verhält.

In einem nächsten Schritt wurde durch Komplementations-Experimente getestet, ob der beobachtete Phänotyp für Cs (erhöhte Cs-Anreicherung und Sensitivität gegenüber hohen externen Cs-Konzentrationen) tatsächlich durch das Fehlen von YDR090C verursacht wurde. Aus diesem Grund wurde *ydr090cΔ* mit Expressionsplasmiden transformiert, die YDR090C entweder unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotor (Tet-Promotor) oder des endogenen Promotor stellten. Durch die Komplementation der Mutante *ydr090cΔ* wurde die Sensitivität gegenüber Cs aufgehoben. Zudem

dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb 3.25 A). Die GFP Signale in den komplementierten Mutanten waren schwach, was mit einer eher schwachen Expression des Fusions-Proteins erklärt werden kann. In dem Experiment konnte dennoch eine exklusive Lokalisation von Ydr090cp-yGFP an der Zellperipherie bestimmt werden. Die Lokalisation in der Zellperipherie und die Existenz der sechs potentiellen Transmembran-Domänen legen die Vermutung nahe, dass das Protein entweder in der Plasmamembran oder dem kortikalen ER lokalisiert ist. Vergleicht man die Lokalisation von Ydr090cp-yGFP mit dem ER-Marker Hmg1p-yGFP, zeigen sich deutliche Unterschiede. Das ER-Markerprotein Hmg1p kann neben der Plasmamembran auch in Strukturen detektiert werden, die den Nukleus umgeben. Im Gegensatz dazu konnten keine Signale für Ydr090cp-yGFP außerhalb der Zellperipherie detektiert werden. Daher ist eine Lokalisation von Ydr090cp in der Plasmamembran sehr wahrscheinlich. Um sicher zu gehen, dass das GFP-Fusionsprotein auch funktionell ist, wurde die Cs-Anreicherung in Mutanten bestimmt, die das Fusionsprotein exprimierten. Wie in Abbildung 3.24 dargestellt, führt eine Komplementation der *ydr090cΔ*-Zellen mit YDR090C-yGFP (pSH071) zu einer Reduzierung der Cs-Anreicherung auf Wildtyp-Niveau. Somit sollte die GFP-Signale die Verteilung des funktionellen Proteins in der Zelle widerspiegeln.

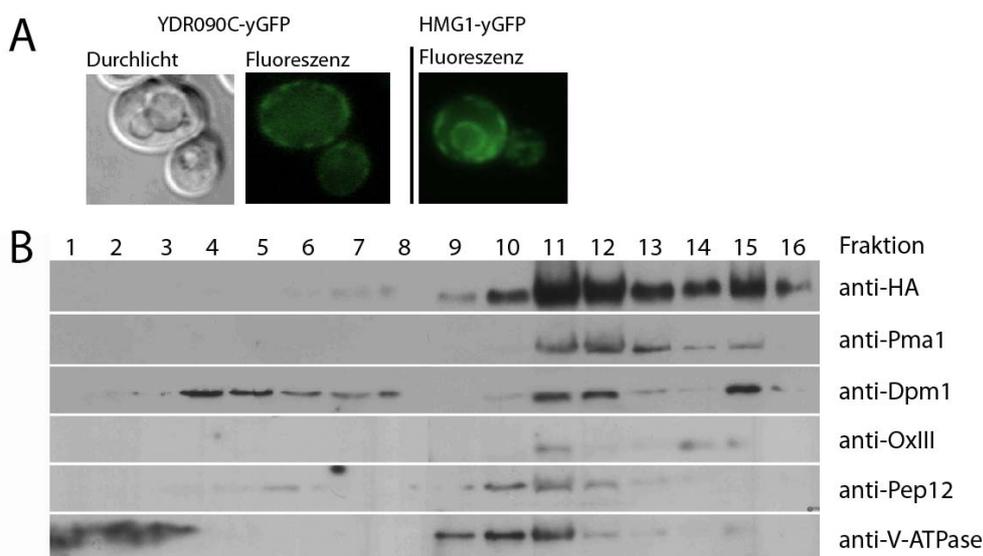


Abbildung 3.25

Lokalisation von Ydr090cp in der Hefezelle

A) Darstellung der Lokalisation von Ydr090cp-yGFP. Das Fusionsprotein wurde in der Mutante *ydr090cΔ* exprimiert. Verstärkte Fluoreszenz konnte in der Zellperipherie gemessen werden, was auf eine Lokalisation in der Plasmamembran hindeutet, da bei einer Lokalisation im ER eine Fluoreszenzverteilung wie im rechts dargestellten Bild um den Nukleus nachweisbar sein sollte (ER-Lokalisation: freundlicherweise bereitgestellt von A. Heuck, ER-Marker: Hmg1p-yGFP).

B) Membranfraktionierung mit *ydr090cΔ*, in dem Plasmid-vermittelt Ydr090cp mit einem HA-Epitop (Ydr090cp-HA₃) unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert wurde. Die Fraktionierung der Membrankomponenten wird detailliert in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Ydr090cp-HA₃ wurde mithilfe eines Antikörpers gegen HA in Fraktion 9 bis 16 nachgewiesen. Ein ähnliches Muster mit dem größten Proteingehalt in Fraktion 11 und 12 weist auch das entsprechende Markerprotein für die Plasmamembran (Pma1p) auf.

Um die erhaltenen Daten aus der GFP-Studie zu untermauern, wurde parallel eine Membranfraktionierung mit Hefenzellen durchgeführt, die Ydr090cp mit einem Hämagglutinin-Epitop (Ydr090cp-HA₃) unter dem endogenen Promotor exprimierten (siehe Abb. 3.25 B). In diesem

Experiment konnte Ydr090cp-HA₃ in Membranfraktionen nachgewiesen werden, was die generelle Aussage unterstützt, dass es sich bei Ydr090cp um ein Transmembranprotein handelt. Die Verteilung des Proteins über die einzelnen Fraktionen der aufgetrennten Membranbestandteile weist zudem auf eine Lokalisation in der Plasmamembran hin. Pma1p, das Markerprotein für die Plasmamembran, und Ydr090cp zeigen ein ähnliches Verteilungsprofil über die verschiedenen Fraktionen auf, wobei das Maximum an Protein in beiden Fällen auf Fraktion 11 und 12 entfällt. Das Markerprotein für das ER, Dmp1p, ist ebenfalls in diesen Fraktionen vertreten. Gleichzeitig kommen Proteine des ER auch in Fraktion 4 bis 7 vor, Ydr090cp jedoch nicht. Auch diese Untersuchung legt demnach nahe, dass Ydr090cp in der Plasmamembran lokalisiert ist.

4. Diskussion

Die Aufnahme radioaktiven Cs und Sr ist schon seit längerem Gegenstand der Forschung. Von besonderem Interesse ist dabei die selektive Aufnahme der Ionen durch verschiedene Organismen. Ein grundlegendes Verständnis der Aufnahmemechanismen, insbesondere die Identifizierung der Proteine, die diese Aufnahme vermitteln, würde Möglichkeiten eröffnen, auf molekularer Ebene die Anreicherung beider radioaktiven Elemente in verschiedenen Nutzpflanzen zu manipulieren. Da zwischen Pflanzen- und Hefezellen viele Ähnlichkeiten bestehen, wie zum Beispiel das Vorkommen einer Zellwand und von Vakuolen, wurde im Rahmen dieser Arbeit am Modelorganismus *Saccharomyces cerevisiae* eine Studie zur Cs- und Sr-Anreicherung durchgeführt. Zirka 4800 verschiedenen, haploiden Mutantenstämmen, die jeweils für ein bestimmtes Gen defizient waren, wurden hinsichtlich ihrer Cs- und Sr-Anreicherung untersucht. Gene, die für das Wachstum der Hefen in Vollmedium essentiell sind, wurden in dieser Untersuchung nicht eingeschlossen. Da alle untersuchten Hefemutanten in dieser Arbeit von einem Wildtyp (BY4741) abstammen, wurden initiale Experimente immer mit dem Wildtyp durchgeführt, da dieser als Referenz für die Beurteilung des Mutanten diente.

4.1 BY4741 toleriert hohe, extrazelluläre Cs- und Sr-Konzentrationen

Um die Ergebnisse dieser Untersuchung besser auswerten zu können, wurde die Toxizität von Cs und Sr gegenüber dem hier verwendeten Hefestamm (BY4741) ermittelt. *S. cerevisiae* wird als Cs-toleranter Pilz klassifiziert (Avery 1995). Vorangegangene Untersuchungen zeigten minimale inhibitorische Konzentration (MIK) von ca. 50 mM bis über 80 mM CsCl für verschiedene Hefestämme (u.a. X2180-1B, NCYC 1534). Im Vergleich dazu zeigt eine weitere Pilzgattung, *Rhodotorula rubra*, eine deutlich geringere Toleranz gegenüber dem Alkalimetall. Die MIK beträgt für diesen Pilz 36 mM und liegt weit unter den angegebenen MIK für die *S. cerevisiae*-Stämme (Perkins & Gadd 1993). Der hier verwendete Stamm BY4741 zeigte ab 75 mM CsCl eine merkliche Einschränkung des Wachstums (siehe Abb. 3.1), was sehr gut mit den Daten von Perkins et al übereinstimmt. In beiden Fällen entsprach das Verhältnis von K zu Cs im Medium ca. 1:7, wenn eine Inhibition des Wachstums festgestellt wurde (Perkins 1993, eigene Daten), also einem relativ hohen Überschuss an Cs. Avery erklärte die Toleranz gegenüber höheren Cs-Konzentrationen mit der Sequestrierung des Ions in die Vakuole. In *S. cerevisiae* werden schätzungsweise 90 % des aufgenommenen Cs in die Vakuole eingeschleust, wohingegen es bei *R. rubra*, dem Cs-sensitiven Pilz, lediglich 60 % sind (Perkins & Gadd 1993, Avery 1995).

Für das zweite untersuchte Ion, Sr, wurden in der hier vorliegenden Arbeit erstmals Daten zur Wechselwirkungen mit Hefezellen ermittelt. Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass *S. cerevisiae* auch in Gegenwart sehr hoher Sr-Konzentrationen wachsen kann. Erst ab 500 mM SrCl₂ im Medium wurde ein eingeschränktes Wachstum festgestellt. Wie in Abschnitt 1.3.5 bereits hervorgehoben wurde, besteht sehr große biologische Ähnlichkeit zwischen Sr und Ca. Es wird angenommen, dass Sr primär auf den gleichen Wegen wie Ca in die Zelle gelangt und des Weiteren auch der gleichen Regulation unterliegt (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984). Im Rahmen dieser Arbeit

wurden außerdem Toxizitäts-Experimente mit anderen Kationen durchgeführt. Dabei konnte auch für Ca-Konzentrationen bis 250 mM keine toxischen Effekte für den Hefestamm BY4741 festgestellt werden (höhere Konzentration wurden nicht getestet). In einigen Veröffentlichungen wird ein uneingeschränktes Wachstum bis zu 100 mM angegeben, wobei diese Angabe nicht als MIK definiert ist (Cunningham & Fink 1994a, Dunn et al. 1994). Die Hefezellen zeigen somit eine größere Toleranz gegenüber Sr und Ca als gegenüber Cs. Ca ist ein essentielles Ion, wird aber in geringeren Konzentrationen von der Zelle benötigt. Folglich ist auch die Aufnahme von Ca deutlich geringer als von K (und Cs). Weiterhin ist die Zelle bestrebt, die Ca-Konzentration im Cytosol möglichst gering zu halten ($[Ca]_{Cyt} \leq 0,1 \mu M$) (Miller et al. 1990, Cunningham & Fink 1994a). Aus diesem Grund hat die Zelle stark regulierte Mechanismen zur Entfernen der Ca Ionen aus dem Cytosol etabliert. Ca wird dabei vor allem in die Vakuole eingeschleust, in welcher es an Polyphosphate gebunden und somit immobilisiert wird (Dunn et al. 1994). Ein ähnliches Prinzip ist auch für Sr denkbar und würde die hohe Toleranz der Hefezellen erklären.

Vor kurzem durchgeführte Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch Pflanzen, ähnlich wie Hefen, eine weitaus höhere Toleranz gegenüber Sr aufweisen als gegenüber Cs: $MIK_{Cs} = 0,3 \text{ mM}$ und $MIK_{Sr} = 10 \text{ mM}$ (Hauser 2008). Da der zelluläre Aufbau von Hefe- und Pflanzenzellen starke Analogien aufweist, wie z. B. das Vorhandensein von Zellwänden und Vakuolen, ist es wahrscheinlich, dass i) die Regulation der Cs- und Sr-Aufnahme und deren intrazelluläre Verteilung und ii) die schädigenden Mechanismen beider Ionen Parallelen aufweisen. Weiterhin kann anhand der hier vorgestellten Toxizitäts-Experimenten geschlussfolgert werden, dass die verwendeten Konzentrationen von $50 \mu M$ CsCl bzw. $SrCl_2$ in der genomweiten Aufnahmestudie auf physiologischer Ebene keine negativen Effekte haben sollten.

4.2 BY4741 kann große Mengen an Cs und Sr anreichern

Für den Wildtyp wurden weiterhin die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme bestimmt, um den hier durchgeführten Aufnahme-Assay hinsichtlich seiner Verwendbarkeit und Vergleichbarkeit mit ähnlichen experimentellen Ansätzen zu untersuchen. Betrachtet man die Abhängigkeit der Cs-Aufnahme von der externen Cs-Konzentration ($[Cs]_{ex}$), so ließ sich diese sehr gut mit Hilfe der Hill-Gleichung beschreiben, die einen sigmoidalen Charakter besitzt. Auch in einer vergleichbaren Arbeit zur Cs-Aufnahme in Delft II-Hefezellen wurde eine sigmoidale Beziehung zwischen $[Cs]_{ex}$ und der Cs-Aufnahmerate ermittelt (Derks & Borst-Pauwels 1979), was auf eine Beteiligung verschiedener Faktoren bei der Cs-Aufnahme schließen lässt. Allerdings kann auch ein einzelner Transporter mit modulierbarer Kinetik (also verschiedene Bindestellen für Ionen) ein ebensolches Aufnahmeverhalten zeigen (Rodriguez-Navarro 2000). Der K_m -Wert für die Cs-Aufnahme betrug in der hier durchgeführten Untersuchung $9,45 \text{ mM}$ und zeigte somit eine gute Übereinstimmung mit Literaturwerten von 7 mM (Armstrong & Rothstein 1964). Anhand dieses K_m -Wertes kann auf eine eher geringe Affinität der Transportproteine für Cs geschlossen werden. Im Vergleich dazu zeigten Aufnahmeversuche in Hefezellen für das essentielle K einen K_m -Wert von $0,5 \text{ mM}$ (Armstrong & Rothstein 1964). In speziellem Medium auf Basis von Arginin und in Abwesenheit von NH_4^+ konnten sogar ein K_m von $24 \mu M$ für K ermittelt werden (Rodriguez-Navarro & Ramos 1984).

Die Sr-Aufnahme der Hefezellen ist ebenfalls nur unzureichend mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreibbar. In erster Annäherung kann anhand dieser Gleichung ein K_m -Wert von 9 mM errechnet werden. In der Literatur wird die Aufnahme von divalenten Kationen (Ca und Sr) mit einem dualen Mechanismus beschrieben, der anhand von Auswertungen nach der Methode von Hofstee charakterisiert wurde (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984). Das Hofstee-Diagramm dient zur Gegenüberstellung der Aufnahmerate (v) und dem Quotient aus Aufnahmerate und Ionenkonzentration im Medium (v/c). Im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik würde sich daraus eine lineare Beziehung ergeben. Die hier erhobenen Daten zeigten jedoch einen konkav geformten Graphen (siehe Abb. 3.3 B.1), wie er auch in Arbeiten von Borst-Pauwels beschrieben wird. Dieser kann formal durch die Summe zweier Michaelis-Menten-Gleichungen beschrieben werden, aus der sich 2 Komponenten ableiten, die zur Aufnahme von Ca und Sr beitragen: eine hochaffine und eine niederaffine Komponente, die in der zitierten Veröffentlichung mit einem $K_{m,1}$ von 0,1 mM bzw. $K_{m,2} = 2-6,5$ mM (K_m ist pH-abhängig) angegeben werden (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984). Der niederaffine Sr-Transport ($K_m \sim 9$ mM) konnte auch in der vorliegenden Arbeit berechnet werden. Anhand dieser vergleichbaren Kinetikdaten ((Borst-Pauwels & Theuvenet 1984), eigene Daten) wurden verschiedene Varianten für die Aufnahme von Ca und Sr postuliert: eine Möglichkeit ist die Existenz zweier unterschiedlicher Ca-Transportsysteme mit jeweils einer Ionen-Bindestelle, welche den Affinitäten $K_{m,1}$ und $K_{m,2}$ zugeordnet werden. Es ist jedoch auch möglich, dass es sich lediglich um ein Transportsystem handelt, das jedoch zwei Bindestellen für Sr bzw. Ca aufweist (zum Beispiel Aktivierungs- und Transportbindestelle), wobei es sich wahrscheinlich um einen Kanal handelt (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984). Nachfolgende Arbeiten durch Locke et al. identifizierten einen Ca-permeablen Kanal in der Plasmamembran der Hefezelle, der von den Proteinen Cch1p und Mid1p gebildet wird (Locke et al. 2000). Mutanten für diese beiden Gene standen in der untersuchten Hefemutanten-Kollektion jedoch nicht zur Verfügung, so dass die Aufnahme von Sr über diesen Kanal nicht genauer untersucht werden konnte.

Ein direkter Vergleich zwischen der Aufnahme von Cs und Sr offenbart, dass Cs viel schneller in die Hefezellen gelangt als Sr. Die Aufnahmeraten für Cs und Sr können in Abschnitt 3.2.2 nachvollzogen werden, wobei die berechneten maximalen Aufnahmeraten V_{max} gleich $5,4 \text{ nmol}/(1 \times 10^7 \text{ Zellen} \cdot \text{min})$ für Cs beziehungsweise $0,18 \text{ nmol}/(1 \times 10^7 \text{ Zellen} \cdot \text{min})$ für Sr betragen. Somit ist die Cs-Aufnahme um den Faktor 30 schneller als die Sr-Aufnahme. Vergleichbare Aufnahmeraten sind auch in der Literatur zu finden (für Cs: (Perkins & Gadd 1993); für Sr: (Nieuwenhuis et al. 1981)). Die verhältnismäßig geringe Aufnahmerate von Sr resultiert dabei aus dem Zusammenspiel einer etwa gleich starken Aufnahme- wie Abgaberate für das Ion (Nieuwenhuis et al. 1981). Gleichzeitig kann eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen für Cs (bis zu ~ 180 mM) als für Sr (max. 40 mM) erreicht werden, was höchstwahrscheinlich auch zur größeren Toxizität von Cs beiträgt. Für Cs wurde bereits eine vergleichbare Anreicherung von ca. 130 mM in Stamm X2180-1B beschrieben (Perkins & Gadd 1993). Entgegen diesem allgemeinen Trend wurde bei einer externen Cs- und Sr-Konzentration von 0,05 mM aber eine größere Sr-Anreicherung festgestellt. Eine mögliche Ursache könnte in der größeren Messunsicherheit des Gamma-Zählers für Sr liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Daten zur Toxizität der beiden Ionen und auch die Beschreibung der Kinetiken gut mit der vorhandenen Literatur in Einklang bringen lassen. Sowohl der

ausgewählte Hefestamm wie der für diese Arbeit konzipierte Aufnahme-Assay liefern reproduzierbar und vor allem vergleichbare Ergebnisse, die eine Übertragung der nachfolgend beschriebenen Ergebnisse auf andere Systeme erlauben sollte.

4.3 Insgesamt 212 Gene beeinflussen die Cs- und Sr-Anreicherung

Für die hier durchgeführte genomweite Studie wurde der Aufnahmeversuch so konzipiert, dass die Anreicherung von Cs und Sr über 13 h gemessen wurde. Dieser Zeitraum ist, verglichen mit anderen Aufnahmestudien, sehr lang. Dies hat verschiedene Ursachen: in erster Linie war es das Ziel dieser Untersuchung Mutanten zu finden, welche eine signifikant erhöhte bzw. erniedrigte Cs- oder Sr-Anreicherung aufwiesen. Dabei war weniger die Aufnahmezeit für das jeweilige Ion entscheidend, sondern vielmehr die Einstellung einer Gleichgewichts- oder Sättigungskonzentration innerhalb der Zelle. Ein weiterer Faktor war die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten. Betrachtete man den zeitlichen Verlauf der Cs- und Sr-Aufnahme, so wurde nach ca. 8 h eine Sättigung erreicht (Abb. 3.2). Diese Sättigungskonzentration war reproduzierbar und konnte somit zwischen verschiedenen Stämmen (Wildtyp und Mutanten) verglichen werden. Die Auswertung wurde anhand von Z-Scores durchgeführt, wobei ein Z-Score von $|2,5|$ als Auswahlkriterium verwendet wurde (siehe Kapitel 3.3), wie es in vergleichbaren Studien ebenfalls der Fall ist (Eide et al. 2005).

Von den verfügbaren 4862 Mutanten konnten 4724 hinsichtlich ihres Aufnahme- bzw. Anreicherungsverhalten ausgewertet werden. Für 212 Mutanten, was 4 % aller untersuchten Hefemutanten entspricht, konnte anhand von „Rescreens“ und statistischen Analysen (Zweistichproben t-Test mit $\alpha = 5\%$) eine signifikant veränderte Anreicherung von Cs und/oder Sr in Bezug auf den Wildtyp nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, dass zwischen Mutanten mit verminderter und erhöhter Cs-Anreicherung ein Unterschied um den Faktor 125 bestand, im Falle der Sr-Anreicherung konnte eine maximale Differenz um den Faktor 15 ermittelt werden. Vergleichbare Studien in Pflanzensystemen brachten weitaus geringere Unterschiede zum Vorschein: Die Untersuchung verschiedener Weizensorten unter Freilandbedingungen zeigte maximal eine Differenz um Faktor 3 für Cs und 2,6 für Sr (Schimmack et al. 2004, Gerstmann & Schimmack 2006). Eine weitere Studie mit verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Ökotypen, die in hydroponischer Kultur herangezogen wurden, brachte einen maximalen Unterschied um den Faktor 2,11 für Cs und 2,15 für Sr zu Tage (normalisierte Werte) (Hauser 2008).

Die in dieser Arbeit gezeigte, breite Spanne bei der Cs-Anreicherung erklärt sich hauptsächlich durch eine Gruppe von Mutanten, die nahezu gar kein Cs anreichern (ca. 50 x niedriger als Wildtyp, siehe 3.7.3 und 4.4.2). Mutanten mit erhöhter Cs-Anreicherung wiesen maximal einen 2,5-fach erhöhten Cs-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp auf. Sowohl für Cs als auch Sr wurden mehr Mutanten mit einer erhöhten Anreicherung als mit einer verminderten gefunden. Dieses Phänomen ist vor allem bei Kandidaten mit Veränderungen in der Sr-Anreicherung ausgeprägt, ca. 95 % der identifizierten Kandidaten zeigen einen erhöhten Sr-Gehalt (Vergleich Cs: $\sim 60\%$). Es ist bekannt, dass divalente Kationen sehr gut von Zellwandbestandteilen komplexiert werden können (Avery & Tobin 1992). Somit könnte eine Möglichkeit für die Überrepräsentation von Mutanten mit erhöhtem Sr-Gehalt eine starke Adsorption von Sr an der Zellwand der Hefe sein. Diese Möglichkeit wurde jedoch weitestgehend

durch Versuche mit dem Wildtyp BY4741 und einigen zufällig ausgewählten Mutanten ausgeschlossen, die nach der Aufnahme von Cs und Sr und den anschließenden Waschschritten aufgeschlossen wurden. Anschließend wurden Zellwandbestandteile und Überstand getrennt vermessen. Bei allen untersuchten Hefestämmen konnten weniger als 5 % des radioaktiven Sr mit Zellwandfragmenten assoziiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen für eine effiziente Beseitigung eventuell anhaftenden Sr durch die Waschschrritte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei einigen Mutanten, deren Gendeletion zu Veränderungen der Zellwandstruktur oder -beschaffenheit führen, eben jener Aspekt eine Rolle spielte.

Weiterführende Experimente zur Sr-Anreicherung, die in Anwesenheit von Ca durchgeführt wurden, zeigten bei einer Gruppe von Kandidaten eine Einschränkung bei der Sr-Akkumulation (Abschnitt 3.5.3). Die Ca-Homöostase unterliegt zum Großteil der Regulation durch die Ca-abhängigen Proteine Calcineurin und Calmodulin (Cunningham & Fink 1994a, Hiriyama et al. 2003, Matheos et al. 1997). Die molekularen Unterschiede zwischen Ca und Sr könnten ausreichen, um die sonst strikte Regulation der Homöostase bei der ausschließlichen Anwesenheit von Sr teilweise zu beeinträchtigen, da Sr nicht die gleichen Bindeeigenschaften an diese regulatorischen Proteine besitzen muss. Wie in der Einleitung (1.4.2) beschrieben, entspricht das in der Vakuole gespeicherte Ca beinahe dem gesamten zellulären Gehalt. In der Vakuole ist das Ca an anorganische Polyphosphate gebunden und ist auf diese Weise nicht frei verfügbar. Aus der Literatur ist bekannt das Mg und Ca eine ähnlich starke Affinität für diese Polyphosphate aufweisen (Dunn et al. 1994). Würde Sr eine weitaus höhere Affinität zeigen, so könnte vermehrt Sr in der Vakuole akkumuliert und immobilisiert werden. Eine stärkere Bindung an die Polyphosphate könnte zudem die Freisetzung und Wiederverwendung des Sr, die auch zur Ausschleusung aus der Zelle führt, erschweren und die Überrepräsentation von Mutanten mit erhöhtem Sr-Gehalt erklären.

Mit Hilfe der genomweiten Untersuchung zur Cs- und Sr-Anreicherung in der Hefe konnten auch mehrere nicht charakterisierte Gene identifiziert werden (Abschnitt 3.7). Darunter befanden sich auch drei potentielle Transmembranproteine (Ydr090cp, Ydr089wp und Ygr125wp), für die Homologe in Pflanzen gefunden werden konnten (PSI-Blast von SGD, SIMAP). Diese uncharakterisierten Proteine könnten neue Faktoren in der Ionen-Homöostase darstellen. Weiterführende Untersuchungen zu diesen Unbekannten stellen somit auch vielversprechende Ansatzpunkte für eine spätere, gezielte Veränderung der Cs- und Sr-Anreicherung dar.

4.3.1 Wird die Homöostase von Cs und K teilweise unterschiedlich reguliert?

Über die Aufnahme von Cs in Pflanzen ist Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Diesen liegt die Hypothese zugrunde, dass Cs ausschließlich über K-Transportwege in die Zellen gelangt. In dieser Arbeit wurde die Anreicherung von Cs und K gegenübergestellt. Hierzu wurde der K-Gehalt der Zelle mittels ICP-OES ermittelt und mit den Cs-Profilen der Mutanten verglichen. Nur 18 % der untersuchten Mutanten zeigten beides: eine auffällige Cs-Anreicherung und Veränderungen im zellulären K-Gehalt. Bei diesen Kandidatenstämmen bestand in den meisten Fällen eine negative Korrelation zwischen K und Cs, was im Einklang mit früheren Messungen ist: In *A. thaliana*-Ökotypen konnte eine Beziehung zwischen der Cs-Anreicherung und dem K-Gehalt (in Spross und Blättern) hergestellt werden, der sich in einem signifikant erhöhten K-Gehalt bei Pflanzen mit verminderter Cs-Anreicherung äußerte

(Hauser 2008). Die restlichen Hefe-Mutanten zeigten unveränderte K-Konzentrationen (im Vergleich zum Wildtyp), während die Akkumulation von Cs dereguliert war. Weitaus mehr Mutanten mit Cs-Phänotyp zeigten hingegen eine gestörte Ca-Homöostase. Doch welche Verbindungen gibt es zwischen dem Ca-Gehalt der Zelle und Cs-Anreicherung? Zum einen könnten verschiedene Transporter Ca-abhängig reguliert sein. Beispiele für einen solchen Zusammenhang könnten in der Calcineurin-abhängige Regulation vom K-Transporter AKT1 in *A. thaliana* (Xu et al. 2006) oder von Ena1p in der Hefe (Ruiz et al. 2003) gesehen werden. Andererseits sind zeigen viele Mutanten Defekte in der Funktion der V-ATPase oder der Vakuole (siehe 3.6 und 3.7). Die Funktionalität von beiden Komponenten ist wichtig für die Ca- und K- bzw. Cs-Homöostase der Hefezelle.

In einem weiteren Experiment wurde die Aufnahme und Anreicherung von Rb und Cs verglichen. Aufgrund technischer Schwierigkeiten, die der Umgang mit K-Isotopen verursacht, werden vielfach Aufnahmestudien mit Rb durchgeführt und daraus die Charakteristika der K-Aufnahme abgeleitet (Rodriguez-Navarro 2000). Auch diese Untersuchung gab Hinweise darauf, dass die Aufnahme von Cs und Rb über unterschiedliche Transportwege in die Zellen erfolgen könnte oder die Aufnahme verschiedenartig reguliert wird. Für 36 Mutanten (Tabelle 3.3) konnte gezeigt werden, dass sie signifikante Veränderungen in der Cs-Anreicherung aufwiesen, die Rb-Akkumulation wie beim Wildtyp erfolgte (max. 1 Standardabweichung Unterschied). Demnach scheinen diese Genprodukte eine „spezifische“ Regulation der Cs-Anreicherung zu vermitteln und nicht in die K-Homöostase der Zelle einzugreifen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Cs- und K-Aufnahme (teilweise) entkoppelt ist. Folglich müsste es möglich sein durch die gezielte Veränderung des Genoms die Cs-Akkumulation beeinflussen zu können. In dieser Gruppe sind verschiedene Transporter zu finden, die direkt an der Aufnahme von Cs beteiligt sein könnten (KHA1, FCY2) und auch weniger gut charakterisierte Proteine (z. B. YDR090C, siehe 4.7.2).

4.3.2 Die Anreicherung von Sr und Ca unterliegt der gleichen Regulation

Im Gegensatz zu den vergleichenden Experimenten mit Cs und Rb bzw. K konnten zwischen Ca und Sr keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung festgestellt werden. Vielfach zeigten die identifizierten Mutanten für Ca eine extremere Abweichung vom Wildtyp-Verhalten als für Sr. Verschiedene Arbeiten an *A. thaliana* und anderen Pflanzenarten zeigten ebenfalls einen direkten Zusammenhang zwischen Ca- und Sr-Aufnahme. In diesen wurde Ca als ein kompetitiver Inhibitor der Sr-Aufnahme identifiziert. Somit kann geschlussfolgert werden, dass beide Ionen die gleichen Aufnahmewege in die Zelle nutzen (Tamponnet et al. 2008). Anhand der vorliegenden Untersuchung kann nun auch im Modellsystem *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden, dass Sr und Ca durch unterschiedliche Prozessen in die Zellen aufgenommen werden.

4.4 Verschiedene zelluläre Prozesse haben einen Einfluss auf die Cs- und Sr-Anreicherung

Die identifizierten Kandidatenstämme zeigten Defekte in einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse, die in Abschnitt 3.6 zusammengefasst sind. Dabei waren zwei funktionelle Bereiche/Prozesse der Zelle besonders prominent: die Funktion der V-ATPase und die intrazelluläre Proteinsortierung, die in erster Linie zur Vakuolenbiogenese beiträgt. Zu unterscheiden ist dabei, dass eine defekte V-ATPase lediglich die Anreicherung von Cs in der Hefezelle beeinträchtigt. Defekte in der Proteinsortierung haben hingegen sowohl auf die Sr- als auch die Cs-Anreicherung einen Einfluss. Beide Prozesse lassen sich jedoch nicht von einander trennen, da sie sich gegenseitig stark beeinflussen (Bryant & Stevens 1998).

Des Weiteren wurden (wenn auch zu einem geringeren Anteil) Störungen im Metabolismus, dem Ionen- und Metabolitentransport, der Regulation der zellulären Morphologie und der Transkription bzw. Translation mit einer veränderten Cs- und Sr-Anreicherung in Verbindung gebracht.

4.4.1 Defekte in der intrazelluläre Proteinsortierung verändern die Cs- und Sr-Anreicherung

Subzelluläre Kompartimente unterteilen die Zelle in verschiedene Reaktionsräume, in welchen reaktive Spezies zwischengelagert und von einander getrennt werden. Sie dienen aber auch der Durchführung geordneter, das heißt zeitlich und räumlich getrennten Reaktionen. Um diese Funktionalität zu erhalten, müssen neu synthetisierte Proteine spezifisch zu den richtigen Organellen gelangen (Alberts et al. 2003). In Abbildung 4.1 sind die Transportwege von Vesikeln und Proteinen innerhalb einer Wildtyp-Zelle dargestellt. Zu den einzelnen Transportpfaden ist jeweils die Anzahl von identifizierten Mutanten angegeben, die einen Phänotyp für Cs oder Sr aufweisen.

Neu synthetisierte Proteine werden vom ER an den Golgi-Apparat weitergeleitet, wo sie weitere Reifungsprozesse durchlaufen. Am späten Golgi-Apparat erfolgt eine Trennung zwischen Proteinen, die zur Sekretion (der Abgabe in die Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum) oder zum Transport zu intrazellulären Kompartimenten bestimmt sind (Alberts et al. 2003). Die erste beschriebene Transportroute zur Vakuole wurde am Beispiel der Carboxy-Peptidase Y (CPY) aufgeklärt (Piper et al. 1995). Neu synthetisierte Proteine werden am späten Golgi in Clathrin-beschichteten Transportvesikeln angereichert, deren Ziel das späte Endosom (oder prävakuoläres Kompartiment, PVC) darstellt. In diesem Kompartiment findet eine weitere Sortierung der Proteine nach der späteren Lokalisation in der Membran oder im Lumen der Vakuole statt. Die Weitergabe der Proteine an die Vakuole wird höchst wahrscheinlich durch die Verschmelzung endosomaler Kompartimente mit der Vakuolenmembran ermöglicht, obgleich ein Vesikel-vermittelter Transport bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte. Zu einem spätern Zeitpunkt wurde ein weiterer Transportweg zur Vakuole identifiziert, der das PVC umgeht und nach seinem prominentesten Transportgut, der Alkalischen Phosphatase (ALP, entspricht Pho8p) benannt ist – die ALP-Route (Bryant & Stevens 1998, Conibear & Stevens 1998).

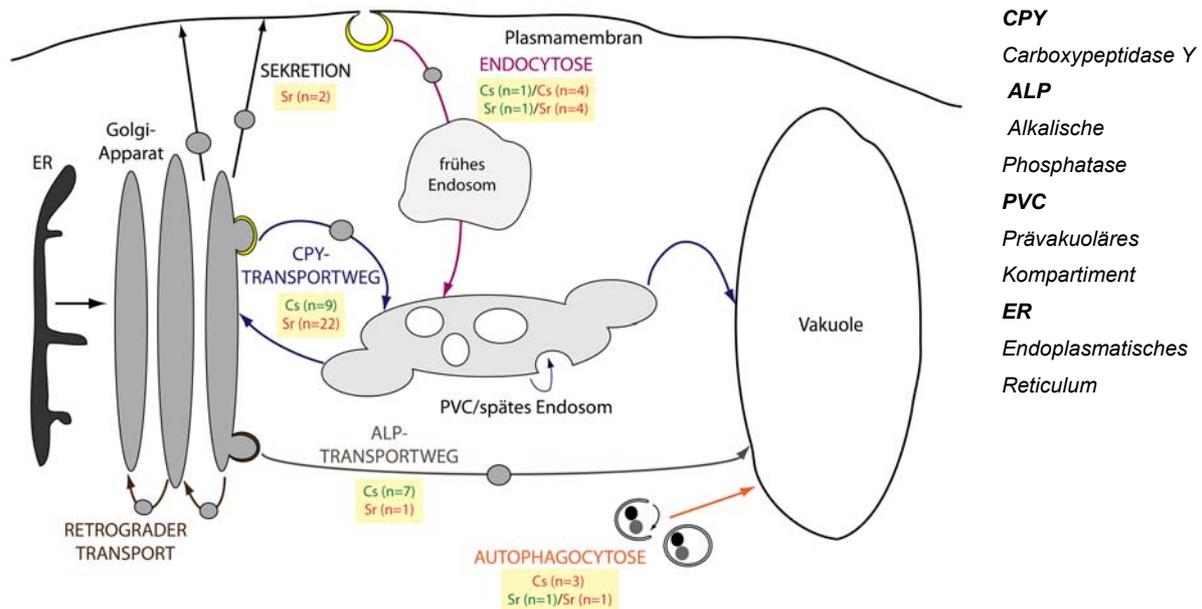


Abbildung 4.1

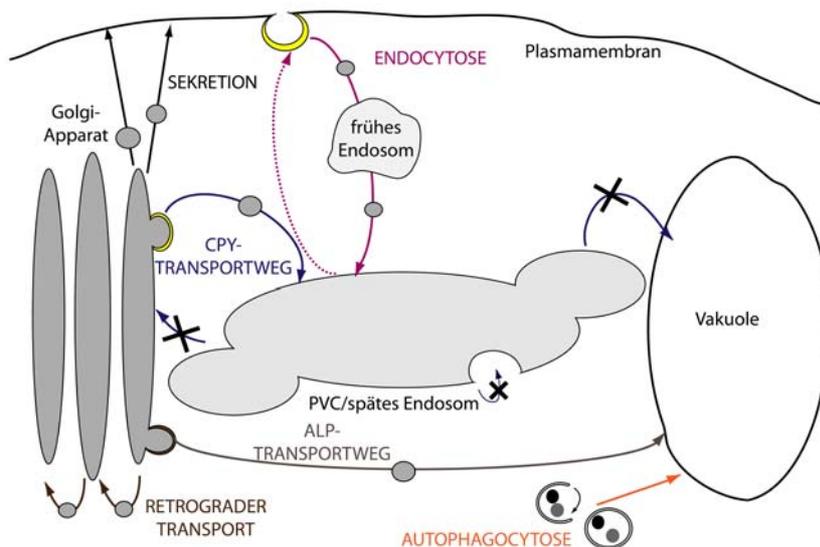
Proteinsortierung in der Hefezelle

Neu gebildete Proteine werden am Golgi entweder zur Zelloberfläche oder über zwei verschiedene Transportrouten zur Vakuole transportiert: über den CPY- oder ALP-Transportweg. Weiterhin werden endocytotisch aufgenommene Proteine über das PVC zur Vakuole weitergeleitet, wo sie degradiert werden oder, cytosolische Proteine werden infolge der Autophagocytose von Membranen umschlossen und an das Lumen der Vakuole abgegeben. Abbildung in Anlehnung an (Bryant & Stevens 1998). Zu den einzelnen Transportwegen ist jeweils die Anzahl der identifizierten Mutanten mit einem Phänotyp für Cs oder Sr angegeben. Rot dargestellt sind Mutanten mit erhöhter Akkumulation, grün jene mit verminderter Anreicherung.

Die hier durchgeführte Analyse von Hefemutanten in Bezug auf ihre Cs- und Sr-Anreicherung identifizierte eine Vielzahl von Kandidaten, deren deletierte Genprodukte eine Rolle im intrazellulären Transport zur Vakuole haben. Dabei lässt sich folgende Tendenz feststellen: Mutanten mit Defekten in der intrazellulären Proteinsortierung neigen zu einer reduzierten Cs-Akkumulation, zu einer erhöhten Sr-Akkumulation oder zu beidem in Kombination. Bereits in einer früheren Arbeit zur Zusammensetzung des Ionenhaushalts von Hefezellen, bei dem alle essentiellen Makro- und Spurenelemente untersucht wurden, konnten eine große Gruppe von Kandidaten mit Störungen in der Vakuolenbiogenese identifiziert werden (Eide et al. 2005). Dabei wiesen viele dieser Mutanten einen deutlich erhöhten Ca-Gehalt auf, analog zur erhöhten Sr-Anreicherung welche in der hier durchgeführten Analyse gemessen wurde. Die Beeinträchtigung der Vakuolenbiogenese führt somit zu einer vermehrten Ca- bzw. Sr-Anreicherung in den Hefezellen.

4.4.1.1 Vps-Mutanten haben einen erhöhten Sr-Gehalt

Alle Kandidaten, die eine erhöhte Sr-Akkumulation zeigen, gehören zur Gruppe der vps-Mutanten (vps = „vacuolar protein sorting“). Wie in Abschnitt 3.7.1 bereits angerissen wurde, teilt man diese Mutanten aufgrund ihrer Vakuolenmorphologie in sechs Klassen ein (A-F). In den vps-Mutanten ist der Proteintransport vom Golgi zur Vakuole an verschiedenen Stellen blockiert, was zu funktionellen und morphologischen Defekten der Vakuole führt (Bowers & Stevens 2005). In Abbildung 4.2 sind die beschriebenen Einschränkungen im Proteintransport exemplarisch für Mutanten der Klasse E dargestellt.



CPY = Carboxypeptidase Y, ALP = Alkalische Phosphatase, PVC = Prävakuoläres Kompartiment

Abbildung 4.2

Defekte in der Protein-sortierung in vps-Mutanten der Klasse E

In Mutanten der Klasse E kommt es zu einer Blockade des intrazellulären Proteintransportes, die zu einer Akkumulation von vakuolären Vorläuferproteinen im PVC führen. Am PVC ist sowohl die Freisetzung der Proteine zur Vakuole als auch der retrograde Transport zurück zum Golgi-Apparat gestört. Weiterhin ist das PVC extrem vergrößert und weist keine intralumenalen Strukturen auf.

Von den sechs Klassen wurden in dieser Arbeit vier identifiziert – aus Klasse A, B, D und E. Dabei zeigten Mutanten der Klasse E ausschließlich eine erhöhte Sr-Anreicherung, während bei Mitgliedern aller weiteren Klassen ebenfalls die Cs-Akkumulation gestört war.

Die Vakuole besitzt eine zentrale Rolle in der Ca-Homöostase der Hefezelle und dient als Speicherort für mehr als 90 % des intrazellulären Ca. Da sich Sr genauso verhält wie Ca, sollte auch beinahe das gesamte Sr in der Vakuole gespeichert werden. Mutationen (*pmc1Δ*) welche den Ca-Transport in die Vakuole drastisch reduzieren führen zu einer starken Sensitivität gegenüber hohen extrazellulären Ca-Konzentrationen (Cunningham & Fink 1994b, Cunningham & Fink 1996, Miseta et al. 1999a). Eine vergleichbare Sensitivität konnte auch für die meisten der hier identifizierten vps-Mutanten nachgewiesen werden (Abschnitt 3.7.1). Im Gegensatz zu *pmc1Δ* weisen die hier aufgezeigten vps-Mutanten aber einen erhöhten Sr- und Ca-Gehalt auf. Miseta et al. konnten am Beispiel einer weiteren vps-Mutante (*vps33Δ*), die in der vorliegenden Arbeit aufgrund ihres schlechten Wachstums nicht auswertbar war, ebenfalls zeigen, dass eine gestörte Vakuolenbiogenese mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber höheren, extrazellulären Ca-Konzentrationen einhergeht. In Analogie zu den hier betrachteten vps-Mutanten wies auch *vps33Δ* einen höheren Ca-Gehalt auf. Die Autoren begründeten diese Beobachtungen damit, dass der Verlust der Vakuole als Speicherorganelle zu einer Umverteilung des Ca in den Golgi-Apparat und möglicherweise auch in andere intrazelluläre Kompartimente durch die zweite Ca-ATPase der Hefezelle, Pmr1p, führt. Aus einer Reihe von Experimenten mit verschiedenen Kombinationen von Transportermutationen in *vps33Δ* wurde in der zitierten Arbeit geschlossen, dass Pmr1p erst bei höheren cytosolischen Konzentrationen die Sequestrierung des Ca vermitteln kann und diese auch nicht so effizient wie durch ihr vakuoläres Pendant Pmc1p erfolgt (Miseta et al. 1999a). Dadurch verbleibt die cytosolische Ca-Konzentration auf einem höheren Niveau als in Wildtypzellen und führt wahrscheinlich zu dem beobachteten Anstieg im totalen Ca- und Sr-Gehalt den Zellen. In Analogie zu diesen Daten kann auch für die hier identifizierten vps-Mutanten eine Deregulierung der Sr-Anreicherung angenommen werden, weil die Vakuolenfunktion stark beeinträchtigt ist. Da in allen beschriebenen Experimenten (siehe 3.5) keine

gravierenden Unterschiede in der Aufnahme und Akkumulation von Ca und Sr gefunden werden konnte, ist es denkbar, dass Pmr1p auch für Sr eine geringe Affinität aufweist und dadurch die cytosolische Konzentration generell erhöht ist. Weiterhin ist eine Aufnahme und Speicherung des Sr in das stark vergrößerte PVC auch nicht auszuschließen. Durch die Blockade des Proteintransportes zur Vakuole könnten funktionelle Transporter auch in der Membran des PVC verbleiben und dort den Sr- und Ca-Transport in dieses Kompartiment ermöglichen.

Im Falle der vps-Mutanten der Klasse E ergibt sich unter Umständen noch eine weitere Möglichkeit, die zur vermehrten Anreicherung von Sr beitragen könnte. Wie in Abb 4.2 gezeigt, ist in diesen Mutanten ein intermediärer Schritt im Transport von neu synthetisierten Proteinen zur Vakuole blockiert. Diese Blockade findet im späten Endosom oder auch prävakuolären Kompartiment (PVC) statt, über welches Proteine prozessiert werden, die den klassischen Weg zur Vakuole einschlagen (CPY-Transportweg). Gleichzeitig stellt das PVC aber auch die Anlaufstelle endocytotisch aufgenommener Proteine aus der Plasmamembran dar. Die Genprodukte der vps E-Mutanten vermitteln im Wildtyp eine Ubiquitin-abhängige Sortierung von Proteinen in intralumenale Vesikel des PVCs. Später werden diese Proteine in das Lumen der Vakuole freigesetzt. Ein Teil der so prozessierten Zielproteine sind im Lumen der Vakuole lokalisiert, es handelt sich vorwiegend um Proteasen bzw. deren Vorläuferproteine. Die zweite Gruppe von Proteinen gelangt von der Plasmamembran in das PVC und wird von dort zur Degradierung in die Vakuole eingeschleust. Die Zelle nutzt somit die Vakuole, um das Level von Transportern oder Rezeptoren in der Plasmamembran zu regulieren (Nelson 2003). In vps-Mutanten der Klasse E kommt es jedoch zu einer Akkumulation der internalisierten Proteine im PVC. In diesem Zusammenhang wurde durch Bugnicourt et al. für Fur4p, eine Uracil-Permease der Plasmamembran, gezeigt, dass es aufgrund der Akkumulation des Proteins im PVC zu einer effizienten Wiederverwendung und Rückführung zur Plasmamembran kommt. Demzufolge sind in vps-Mutanten der Klasse E deutlich mehr der Permeasen in der Plasmamembran vertreten (Bugnicourt et al. 2004). Ähnliches könnte auch für Ca bzw. Sr transportierende Proteine der Fall sein, obgleich bisher keine Untersuchungen dazu vorliegen. So könnte eine erhöhte Anzahl von Transportern oder Kanälen zusätzlich einen verstärkten Einfluss in die Zelle vermitteln.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gesteigerte Sr-Akkumulation in den vps-Mutanten größtenteils durch den Funktionsverlust der Vakuole hervorgerufen wird. Die verlorene Speicherfunktion der Vakuole wird durch andere intrazelluläre Kompartimente und die Aktivität der Ca-ATPase Pmr1p im Golgi-Apparat teilweise kompensiert. Da Pmr1p jedoch eine geringere Affinität für Ca hat als die vakuoläre Ca-ATPase Pmc1p und weniger effizient bei der Ca-Beseitigung aus dem Cytosol ist, kommt es i) zu einer basal erhöhten Ca- und Sr-Konzentration im Cytosol und ii) einer schlechteren Anpassung an veränderte Ca- bzw. Sr-Konzentrationen im Medium (Miseta et al. 1999a), die die erhöhte Sensitivität gegenüber den beiden Ionen erklärt.

Ein Teil der vps-Mutanten weist außerdem eine verminderte Cs-Anreicherung auf. Somit führt eine defekte Proteinsortierung und letztendlich der Verlust der Vakuolenfunktion zu einem völlig entgegen

gesetzten Cs-Phänotyp als es für Sr zu beobachten war. Die Zusammenhänge zwischen Proteinsortierung und Cs-Anreicherung in vps-Mutanten werden im nächsten Kapitel (4.4.1.2) besprochen.

4.4.1.2 Die Cs-Anreicherung wird durch Defekte in der Proteinsortierung vermindert

Bei Kandidaten mit einem Cs-Phänotyp führten Defekte in der intrazellulären Proteinsortierung im Gegensatz zu denen mit Sr-Phänotyp zu einer verminderten Akkumulation des Ions. Es können zwei Gruppen von Mutanten unterschieden werden, die an unterschiedlichen Punkten der Proteinsortierung eine Beeinträchtigung aufweisen.

Die erste Kandidatengruppe umfasst Genprodukte, die in der Bildung von Transportvesikeln am späten Golgi involviert sind. Die Proteine gehören zwei Komplexen (AP-1 und AP-3 Komplex) an, die die Rekrutierung von Hüllproteinen zu bestimmten Stellen der Golgimembran vermitteln, wodurch es zur Ausbildung und Freisetzung von Vesikeln kommt. AP-Komplexe wurde ursprünglich im Zusammenhang mit Clathrin-vermitteltem Vesikeltransport beschrieben. Für den AP-1-Komplex wurde auch eine Interaktion mit Clathrin nachgewiesen und sowohl AP-1 als auch Clathrin spielen eine tragende Rolle beim Transport von vakuolären Proteinen über den klassischen CPY-Transportweg (siehe Abb. 4.1). Fehlt AP-1 so ist nachweislich der Transport ubiquitiniertes Proteine in das Lumen der Vakuole gestört (Phelan et al. 2006). Die Funktion von AP-3-Komplexen in der Hefe wurde erstmals 1997 beschrieben. Die Untereinheiten dieses Komplexes weisen Homologien zu anderen, klassischen AP-Komplexen auf, interagieren aber nicht mit Clathrin (Cowles et al. 1997, Panek et al. 1997). Vielmehr wird vermutet, dass der Komplex mit einem bisher unbekanntem Hüllprotein interagiert, da er ebenfalls die Vesikelbildung am Golgi-Apparat vermitteln kann. Im Gegensatz zu AP-1 wirkt AP-3 am sogenannten alternativen Transportweg zur Vakuole mit, der ALP-Route (Cowles et al. 1997). Jeder der beiden Komplexe ist somit notwendig für den Transport einer bestimmten Gruppe von Proteinen in die Membran oder das Lumen der Vakuole.

Die zweite Gruppe von Kandidaten in dieser Kategorie gehört zur Klasse der vps-Mutanten. Vertreten sind Mitglieder der Klassen A, B und D, die an verschiedene Stufen des intrazellulären Transports Blockaden aufweisen (siehe 3.7.1). In Mutanten der Klasse D findet beispielsweise die Fusion von Vesikeln mit dem PVC und somit der Eintritt von Proteinen in dieses Kompartiment nicht statt (Bowers & Stevens 2005). Proteine der Klasse B spielen in verschiedenen Bereichen des Proteintransports eine Rolle. So vermittelt Vam7p zusammen mit anderen Proteinen die Fusion von endosomalen und vakuolären Membranen (Wada & Anraku 1992, Jun et al. 2007). Vps17p hingegen ist Bestandteil des „Retromers“, einem Komplex, der zur Wiedergewinnung von Protein des Golgis aus endosomalen Kompartimenten benötigt wird (Pfeffer 2001, Seaman 2005).

So ergibt sich ein kompliziertes Interaktionsnetzwerk, das in seiner Gesamtheit die komplexe Aufgabe der Proteinsortierung innerhalb der Hefezelle vermittelt. Der Verlust eines regulierenden Proteins kann somit verschiedene Aspekte des intrazellulären Transports beeinflussen. Was jeder dieser Mutanten jedoch gemeinsam ist, sind Defekte in der Vakuolenfunktion, die auf eine beeinträchtigte Vakuolenbiogenese zurückzuführen ist. Dabei können Abstufungen im Ausmaß der Vakuolenbeeinträchtigungen beobachtet werden, sowohl auf funktioneller als auch auf morphologischer Ebene (Conibear & Stevens 1998, Bowers & Stevens 2005). Durch Einschränkung der Vakuolenfunktion

steht der Hefezelle vermutlich weniger „Speicherplatz“ für Cs zur Verfügung. Da infolge dessen eine geringere Cs-Anreicherung in den Mutanten festgestellt werden kann, ist anzunehmen, dass die cytosolische Cs-Konzentration nur gering ausfällt und Cs effizient aus dem Cytosol entfernt werden kann. Mutanten mit Defekten in der intrazellulären Proteinsortierung neigen auch zur Fehllokalisierung von vakuolären Proteinen in die Plasmamembran oder den extrazellulären Raum (Stevens et al. 1986, Craddock et al. 2008). Unter Umständen können so auch Transporter in die Plasmamembran gelangen, die zusätzlich einen Efflux von Cs gestatten.

4.4.2 Die Funktion der V-ATPase ist essentiell für die Anreicherung von Cs

Neben den Kandidaten, die Defekte in der Proteinsortierung aufweisen, konnte eine weitere Gruppe von Mutanten identifiziert werden, die beinahe alle Untereinheiten der V-ATPase umfasste. Kennzeichnend für diese Gruppe war ein nahezu vollständiger Verlust der Cs-Anreicherung in den Zellen (0,02-fach vom Wildtyp). Im Gegensatz dazu variierte die Sr-Anreicherung innerhalb der Grenzen, die einem Wildtyp-Verhalten zugeordnet werden konnten.

Die V-ATPase ist eine Protonenpumpe, die in Membranen intrazellulärer Kompartimente vorkommt. Sie transportiert aktiv Protonen aus dem Cytosol in die intrazellulären Kompartimente hinein und säuert diese an. V-ATPasen kommen in allen eukaryotischen Organismen vor, aber nur bei *S. cerevisiae* ist ein vollständiger Verlust ihrer Funktion für die Zelle nicht letal (Nelson 2003). Ein Verlust der V-ATPase-Aktivität in *S. cerevisiae* zeichnet sich durch pleiotrope Wirkungen aus, die auf eine Funktion der Protonenpumpe in einer Vielzahl von zellulären Prozessen hindeuten. Die offensichtlichste Aufgabe der V-ATPase ist die Ansäuerung der Vakuole sowie des Golgi-Apparates und des Endosoms. Ein saures Milieu in diesen Kompartimenten ist unter anderem notwendig, um proteolytische Prozesse zu ermöglichen, die zur Degradierung und/oder Reifung von Proteinen beitragen (Yaver et al. 1993, Stevens & Forgac 1997). Außerdem wird der durch die Protonenbewegung generierte pH- und Potential-Gradient (ΔpH und $\Delta\Psi$) verwendet, um chemische Verbindungen und Ionen in die Vakuole und andere Kompartimente hinein zu transportieren. Dieser „sekundäre“ Effekt der V-ATPase könnte auch die Ursache für die beinahe vollständig unterbundene Cs-Anreicherung in den entsprechenden Mutanten darstellen. Wie in einigen Artikeln bereits beschrieben wurde, befindet sich der Großteil des aufgenommenen Cs in der Vakuole (Perkins & Gadd 1993, Avery 1995, Bystrzejewska-Piotrowska & Bazala 2008). Ohne die von der V-ATPase vermittelte Ansäuerung der Vakuole, sind auch die sekundär aktiven Transporter beeinträchtigt, was zu einer Reduzierung der Cs-Aufnahme in die Vakuole führt. Dennoch stellt sich die Frage, warum V-ATPase-Mutanten nahezu gar kein Cs anreichern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Cs im Wildtyp nur deshalb in relativ großen Mengen angereichert wird, gerade weil es in der Vakuole gespeichert wird. Somit würde die Aufnahmerate und -kapazität der Vakuole über das Ausmaß der Cs-Anreicherung in der Hefezelle bestimmen. Ähnliches ist auch für die Ca-Aufnahme in Hefezellen beschrieben worden. Die Aufnahmerate von Ca in die Hefezelle entspricht der Aufnahmerate des Ions in die Vakuole (Dunn et al. 1994). Fällt die Vakuole in den Hefezellen aus, so würde die Kapazität des Cytosols und der anderen Organellen maßgeblich festlegen, wie viel Cs in die Zelle gelangt. Die fast nicht messbare Cs-Anreicherung in den V-ATPase-Mutanten würde dann für eine ausgesprochen

geringe Cs-Kapazität dieser Kompartimente sprechen oder eine sehr effiziente Abgabe des Ions aus der Hefezelle implizieren.

Bisher konnte nicht konkret belegt werden, welche(r) Transporter für den Eintransport von Cs (und K) in die Vakuole verantwortlich sind (ist). Die Existenz eines solchen Transporters wurde jedoch anhand experimenteller Daten impliziert (Martinez-Munoz & Pena 2005). Leider konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit kein putativer, in der Vakuolenmembran lokalisierter Transporter identifiziert werden, dessen Mutation mit einer verringerten Cs-Akkumulation verbunden ist. Neben der direkten Aufnahme über die Vakuolenmembran bestünde auch die Alternative, dass Cs bereits im Golgi-Apparat oder den prävakuolären Kompartimenten angereichert wird und dort verbleibt oder durch Vesikelfusionen in die Vakuole gelangt. In Abschnitt 1.4.2.2 wurde der putative K^+/H^+ -Antiporter Kha1p vorgestellt. Anhand von verschiedenen Experimenten konnte dieses Protein der Membran des Golgi-Apparates zugeordnet werden (Flis et al. 2005). Im Endosom gibt es außerdem einen Na^+/H^+ -Antiporter (Nhx1p), der ähnlich wie Nha1p ebenfalls eine Affinität für K und Cs aufweist. Beide Proteine könnten die Aufnahme von Cs über „Umwege“ wie Golgi-Apparat und endosomale Kompartimente in die Vakuole vermitteln. Bekannt ist, dass nhx1 Δ sensitiv gegenüber verschiedenen monovalenten Kationen ist, darunter auch Cs. Die Ursache für diese Sensitivität wird mit einer fehlenden „Entsorgung“ toxischer Kationen in intrazelluläre Kompartimente begründet (Flis et al. 2005, Kinclova-Zimmermannova et al. 2006). Folglich scheint die Vakuole nicht zwangsläufig als einziges intrazelluläres Kompartiment zur Detoxifizierung beizutragen. Die Mutanten zu beiden Transportern, kha1 Δ und nhx1 Δ , weisen in der vorliegenden Analyse ebenfalls eine verminderte Cs-Anreicherung auf, diese ist im Vergleich zu den V-ATPase-Mutanten jedoch nur schwach ausgeprägt (kha1 Δ : 0,59-fache und nhx1 Δ : 0,64-fache Anreicherung vom Wildtyp). Daraus ergeben sich zwei mögliche Erklärungen: i) es gibt weitere, nicht identifizierte Transportproteine, die eine Cs-Aufnahme in die Vakuole vermitteln oder ii) andere Funktionen der V-ATPase beeinträchtigen die Cs-Akkumulation zusätzlich.

Neben der fehlenden Ansäuerung der intrazellulären Kompartimente wird auch die Sortierung sekretorischer Proteine im Golgi-Apparat durch das Fehlen der V-ATPase beeinträchtigt (Nelson & Nelson 1990, Umemoto et al. 1990, Yaver et al. 1993, Perzov et al. 2002). Dies kann zur Fehllokalisierung oder Fehlfaltung von Proteinen der Plasmamembran führen. Am Beispiel von Pma1p, der Protonenpumpe der Plasmamembran, wurde bereits eine Beteiligung der V-ATPase an deren korrekter Assemblierung und Lokalisation nachgewiesen. Hefezellen, die keine funktionelle V-ATPase mehr besaßen, zeigten ein deutlich reduziertes Vorkommen von Pma1p in der Plasmamembran und eine Akkumulation des inaktiven Proteins im ER (Perzov et al. 2000). Dies ist nur ein bekanntes Beispiel für das Zusammenspiel der V-ATPase und der Plasmamembran-Biogenese, sprich, der Sekretion von Plasmamembran-Proteinen. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine eingeschränkte V-ATPase-Aktivität auch das Vorkommen anderer Proteine der Plasmamembran negativ beeinflusst. Darunter könnten auch Transporter sein, die die Aufnahme von Cs in die Zelle ermöglichen.

Neben der Ansäuerung verschiedener intrazellulärer Kompartimente und der Beteiligung an sekretorischen Prozessen stellt der Einfluss der V-ATPase auf die intrazelluläre Proteinsortierung eine dritte mögliche Ursache für eine verminderte Cs-Anreicherung dar. In mehreren Arbeiten konnten bereits gezeigt werden, dass der Verlust der V-ATPase-Aktivität zur Akkumulation von vakuolären

Vorläuferproteinen in endosomalen Kompartimenten der Zelle führt (Yaver et al. 1993, Nelson 2003). Auf diese Weise beeinflusst die V-ATPase ebenfalls die Vakuolenbiogenese. Ihr Fehlen hätte somit auch eine Veränderung der Proteinzusammensetzung in Vakuolenmembran und -lumen und somit indirekt auch eine modifizierte Ionenaufnahme zur Folge.

4.5 Verschiedene Transportproteine beeinflussen die Cs-Anreicherung

Neben den zuvor beschriebenen Kandidaten konnte auch eine kleine Gruppe von Transportern identifiziert werden. Diese Gruppe umfasst sowohl Ionen- als auch Metabolit-Transportproteine.

Die Mutante des primären K-Transporters (Trk1p) zeigte eine stark vermehrte Anreicherung von Cs und auch Sr. Ähnliche Effekte werden auch für weitere mono- und divalente Kationen beobachtet und auf eine Hyperpolarisation der Plasmamembran in *trk1Δ*-Zellen zurückgeführt. Aufgrund dieser Hyperpolarisierung werden unspezifische Transportsysteme der Plasmamembran aktiviert, welche die Zelle für eine ganze Reihe von Ionen und Verbindungen stark permeabel machen (Madrid 1998). Untersuchungen zeigten, der K-Transport durch Trk1p abhängig ist vom intrazellulären K-Gehalt (Rodriguez-Navarro 2000). Zusätzlich wird die Aktivität des Transporters auch durch Phosphorylierung stimuliert. Die Aktivität wird dabei einerseits durch die Kinasen Sat4p (Hal4p) und Hal5p und andererseits von den Phosphatasen Ppz1p und Ppz2p kontrolliert (Mulet et al. 1999, Yenush et al. 2005, Perez-Valle et al. 2007). In der aktuellen Studie konnte jedoch für keine der zugehörigen Mutanten eine Veränderung in der Cs-Anreicherung gemessen werden (einzig *ppz1Δ* wies eine erhöhte Sr-Anreicherung auf). Dies könnte entweder bedeuten, dass Trk1p lediglich einen kleinen Beitrag zur Cs-Akkumulation liefert oder aber die Funktion der regulatorischen Proteine so redundant ist, dass in den Einzelmutanten keine Effekte messbar sind. Für die Redundanz der regulatorischen Proteine würde sprechen, dass die Doppelmutante *sat4Δhal5Δ* einen ähnlichen Phänotyp wie *trk1Δ(trk2Δ)*-Zellen aufweist (Mulet et al. 1999). Aus diesem Grund könnte eine Untersuchung der Cs-Anreicherung in *ppz1Δppz2Δ*-Zellen Aufschluss darüber geben, in wieweit Trk1p an der Cs-Aufnahme Anteil hat, da in diesen Zellen die Trk1p-Aktivität erhöht sein sollte. Eine gesteigerte Cs-Aufnahme wäre folglich mit der Funktion von Trk1p assoziierbar. Wodurch es in den *trk1Δ*-Zellen zu einer erhöhten Sr-Anreicherung kommt, ist nicht genau bekannt. Denkbar wäre aber wie für monovalente Kationen ebenfalls eine veränderte Permeabilität der Hefezellen aufgrund der hyperpolarisierten Plasmamembran. Arbeiten von Borst-Pauwels et al. legten nahe, dass das Oberflächenpotential der Zelle maßgeblich die Aufnahmerate divalenter Kationen beeinflusst (Borst-Pauwels & Theuvenet 1984).

Ähnlich wie *trk1Δ*-Zellen wiesen auch Mutanten für PMP3 eine vermehrte Anreicherung von Cs und Sr auf. Auch diese resultiert aus einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran, die zur Permeabilisierung der Zelle gegenüber einem breiten Spektrum von Kationen beiträgt (Navarre & Goffeau 2000). Pmp3p ist ein Vertreter kleiner Proteolipide, die in der Plasmamembran vorkommen. Es zeigt Homologien zu pflanzlichen Polypeptiden, die unter Salzstress überexprimiert werden. Leider ist es nicht gelungen, PMP3 im Mutantenstamm *pmp3Δ* zu überexprimieren, was vielleicht an der geringen Größe des Polypeptids von 55 Aminosäuren liegen könnte. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass der Verlust von Pmp3p in der Hefe durch die Expression des homologen Proteins

RCI2A aus *A. thaliana* kompensiert werden konnte (Navarre & Goffeau 2000). Folglich scheint die Funktion dieses Polypeptids in beiden Organismen ähnlich zu sein und auch in der Hefe mit der Ionenhomöostase assoziiert zu sein.

Für die Anreicherung von Cs konnten noch weitere Transportproteine identifiziert werden: Kha1p, Fcy2p und Fps1p. Die Funktion von Kha1p und seine Rolle im intrazellulären Cs-Transport wurden bereits in Abschnitt 4.4.2 besprochen. Der Transporter scheint eine Affinität für Cs zu haben, weshalb der Verlust von Kha1p den Übertritt des Kations in intrazelluläre Kompartimente und die dortige Anreicherung verringert und wahrscheinlich auf diese Weise zu einem reduzierten Cs-Gehalt beiträgt (siehe Abschnitt 3.8). Fcy2p hingegen ist eine Cytosin-Permease in der Plasmamembran (Pinson et al. 1996). Auch deren Deletion führt zu einem reduzierten Cs-Gehalt. In Hefe existieren zwei weitere FCY-Allele, FCY21 und FCY22, für die beiden zugehörigen Deletionsmutanten konnten jedoch keine Effekte hinsichtlich der Cs-Anreicherung beobachtet werden. Zwischen den drei Proteinen besteht eine starke Homologie (FCY21: 78 % Identität; FCY22: 88 % Identität). Die einzige Auffälligkeit sind 60 Aminosäuren am N-Terminus von Fcy2p, die in den beiden anderen Proteinen nicht vorkommen. Demnach muss Fcy2p neben dem Transport von Nukleobasen (Cytosin, Purin) eine weitere Funktion in der Zelle besitzen, die nicht durch die beiden Homologen Fcy21p und Fcy22p kompensiert werden kann. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass Cs in Form eines Symports über diesen Transporter in die Zelle aufgenommen wird. In Arbeiten zur Identifizierung von Kandidaten, welche die stark gestörte K-Aufnahme von *trk1Δtrk2Δ*-Zellen kompensieren, wurden ungewöhnlich viele Mutanten für Aminosäure- und Glucose-Transporter gefunden (Wright et al. 1997, Liang et al. 1998). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Transporter für verschiedene Metabolite ebenfalls an der K-Aufnahme beteiligt sind. Es ist zudem anzunehmen, dass diese Transportprozesse wenig spezifisch für K sind und somit auch eine vermehrte Aufnahme von Cs ermöglichen. Mit Fcy2p wird nun ein weiterer „unspezifischer“ Transporter für die Aufnahme von Cs und vielleicht auch K präsentiert.

Fps1 Δ -Zellen hingegen zeigen einen erhöhten Cs-Gehalt. Dies deutet entweder auf einen indirekten Einfluss des Proteins auf die Cs-Anreicherung hin, oder auf eine aktive Rolle bei der Ausschleusung des Ions. Fps1p ist ein Kanal, der den Export von Glycerin und Essigsäure katalysiert, und gleichzeitig für die Aufnahme von Metalloiden verantwortlich ist (Tamas et al. 1999, Wysocki et al. 2001). Aufgrund dieses breiten Spektrums an Transportgütern ist es vorstellbar, dass dieses Protein ebenfalls an der Abgabe von Cs beteiligt ist. Hervorzuheben ist zudem, dass die Mutante *fps1Δ* ausschließlich für die Cs-Anreicherung Veränderungen aufweist.

4.6 In einigen Transportermutanten ist die Sr-Anreicherung verändert

Im Hinblick auf die Sr-Anreicherung wurden keine Unterschiede zum essentiellen Ca gefunden. Aber mithilfe der vorliegenden Daten können zusätzliche Proteine mit der Ca-Homöostase assoziiert werden. Neben der Ca^{2+} -ATPase Pmc1p (siehe Abschnitt 1.4.2.2) führt der Verlust zweier weiterer Transporter zu einer Verminderung der Sr-Anreicherung. Bei einem der Transporter handelt es sich um Nha1p, ein Protein, das an der Regulation des zellulären K- und Na-Haushalts beteiligt ist. Nha1p ist ein konstitutiv exprimierter Na^+/H^+ -Antiporter der Plasmamembran, der den Austausch von cytosolischem Na und K gegen extrazelluläre Protonen katalysiert (Banuelos et al. 1998, Kinclova-

Zimmermannova et al. 2006). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass dieses Protein Ca bzw. Sr transportiert, da im Allgemeinen die Affinität von Transportern monovalenter Kationen für Ca (oder Sr) sehr gering ist (Armstrong & Rothstein 1964). Neben der Funktion in der K- und Na-Homöostase beeinflusst Nha1p zusätzlich den Zellzyklus, wobei diese Funktion nicht mit der Aufnahme von Ionen verknüpft ist (Simon et al. 2003). Es ist daher möglich, dass der beobachtete Effekt auf die Ca- und Sr-Anreicherung ebenfalls unabhängig von der Funktion als Ionentransporter ist. Ob eine Verbindung zwischen einer regulatorischen Funktion in der Ca- und Sr-Anreicherung und der Funktion im Zellzyklus vorliegt, bleibt spekulativ.

Der zweite Transporter, dessen Verlust eine verringerte Sr-Anreicherung vermittelt, ist Tpo1p, ein Polyamintransporter in der Vakuolenmembran. Dieser kann als Folge von Phosphorylierungen auch in die Plasmamembran sortiert werden (Tomitori et al. 1999, Uemura et al. 2005). Das Protein vermittelt in pH-abhängiger Weise den Transport von Polyaminen (aliphatische Polykationen) wie Putrescin, Spermin und Spermidin (in der Regel aus dem Cytosol heraus) und vermittelt so die Toleranz der Hefezellen gegenüber diesen Verbindungen (Tomitori et al. 1999). Die Tpo1p-Funktion ist abhängig von der V-ATPase-Aktivität. Es ergeben sich nun mehrere Möglichkeiten, wie der Verlust von TPO1 die Sr-Anreicherung beeinflusst. Möglich wäre eine Affinität des Transporters neben den erwähnten aliphatischen Polykationen für weitere Kationen. Dementsprechend würde der Transport von Ca und Sr durch Tpo1p in die Vakuole in dieser Mutante unterbunden sein. Eine weitere Alternative wäre ein Effekt von Polyaminen auf die Ionenhomöostase der Zelle. Frühere Untersuchungen offenbarten einen verringerten Polyaminspiegel in *tpo1Δ*-Zellen (Tomitori et al. 2001). Eine weitere Arbeit zeigte außerdem, dass *A. thaliana*-Mutanten, die Polyamine nicht herstellen können, Ca-defizient sind (Yamaguchi et al. 2006). Dieser Mangel an intrazellulärem Ca in *A. thaliana* ist vergleichbar mit der hier beobachteten, verminderten Sr- bzw. Ca-Anreicherung in *tpo1Δ*-Zellen. Die genaue Verbindung zwischen Ca- bzw. Sr-Homöostase und dem Polyamin-Gehalt der Zelle ist bisher jedoch nicht geklärt. Neben dem Einfluss auf den Ca- und Sr-Gehalt einer Zelle, wird auch die Aufnahme von monovalenten Kationen durch Polyamine verändert. Am Beispiel von Gerste und *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass durch den zellulären Polyaminspiegel auch die K- und Na-Homöostase beeinflusst wird (Yamaguchi et al. 2006, Zhao et al. 2007). Dabei modifiziert der intrazelluläre Polyaminspiegel sowohl die Aufnahme als auch Abgabe dieser Kationen. In diesem Zusammenhang ist wahrscheinlich auch die erhöhte Cs-Anreicherung in *tpo1Δ*-Zellen in der vorliegenden Arbeit zu sehen.

Zusätzlich zu Tpo1p kommen in Hefe drei weitere Polyamintransporter vor: Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p (Tomitori et al. 2001). Alle drei zeigen jedoch eine Wildtyp-ähnliche Anreicherung von Cs und Sr. Unter den vier verschiedenen Polyamintransporter (Tpo1-4p) besteht eine etwa 30 %-ige Sequenzidentität auf Aminosäurebasis. Unterschiede sind vor allem in den N- und C-Termini der Transporter zu finden. Die Unterschiede in der Cs- und Sr-Anreicherung in den einzelnen Mutanten könnte somit ein Ergebnis verschiedenartiger Regulation sein. Oder aber die Spezifität der Transporter variiert aufgrund der Sequenzunterschiede in den Termini der Proteine so stark, dass Tpo1p andere Funktionen aufweist als seine Homologen.

Die Deletion von Transportproteinen wurde jedoch in drei Fällen auch mit einer vermehrten Sr-Anreicherung assoziiert. Zum einen verursacht der Verlust von Nhx1p (ein endosomaler Na^+/H^+ -Antiporter) eine erhöhte Sr-Anreicherung in Hefezellen. Diese ist jedoch mit der Funktion des Transporters bei der intrazellulären Proteinsortierung erklärbar, da Nhx1p Proteinen der vps-Klasse E zugeordnet wird (siehe Abschnitt 3.7.1.1 und 4.4.1.1) (Bowers & Stevens 2005). Interessanterweise zeigen die Mutanten für die verwandten Transporter Nhx1p und Nha1p exakt die umgekehrten Phänotypen für Sr auf (und auch Cs, aber hier ist die Ausprägung des Phänotyps schwächer). Die zwei Transporter weisen auf Aminosäureebene nur geringe Identität auf (18 %), besitzen aber beide die verwandte Na^+/H^+ -Austauscher-Domäne (IPR006153). Weiterhin unterscheiden sie sich in ihrer Lokalisation: Nha1p ist in der Plasmamembran und Nhx1p in endosomalen Kompartimenten zu finden. Ob dieser Zusammenhang nur zufällig ist oder vielleicht doch der Transport von monovalenten Kationen auf eine bisher nicht bekannte Weise die Anreicherung von Sr beeinflusst, ist unklar.

Weiterhin zeigen *spf1Δ*-Zellen eine deutlich erhöhte Sr-Akkumulation. Spf1p gehört zur Gruppe der Ca-ATPasen von P-Typ und ist nachweisbar an der Ca-Homöostase der Hefezelle beteiligt. Eine Transportaktivität für Ca konnte für dieses Protein bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Moment wird eher vermutet, dass eventuell Mg das Substrat dieser P-Typ ATPase darstellt (Cronin et al. 2002). Spf1p ist im ER lokalisiert und besitzt eine essentielle Rolle in der Einstellung der Ca-Konzentration dieses Kompartiments, die für eine korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine notwendig ist. Der Effekt auf die Sr-Anreicherung durch die Deletion dieser ATPase ist wahrscheinlich eher durch die Beeinträchtigung der Proteinsynthese und -sortierung zu erklären als durch eine konkrete Transportfunktion des Proteins für das Ion.

Der letzte der drei Kandidaten mit erhöhter Sr-Akkumulation ist Mch5p, ein Riboflavin-Transporter der Plasmamembran. Riboflavin ist ein Vitamin (Vitamin B₂), das eine Vorstufe der Flavin-Coenzyme FAD und FMN darstellt. Hefezellen können Riboflavin selbst synthetisieren und erst kürzlich wurde Mch5p als ein Riboflavintransporter identifiziert, dessen Überexpression die Defekte der Riboflavinsynthesemutante *rib5Δ* kompensiert (Reihl & Stolz 2005). Die beiden Co-Enzyme FAD und FMN sind essentiell für die Bildung von Disulfidbrücken (Oxidation von Proteinen), die sowohl in sekretierten Proteinen als auch bei Proteinen des Vakuolenlumen wichtig für die Stabilität sind. Eine Einschränkung der Protein-Oxidation durch einen Mangel an FAD und FMN äußert sich unter anderem in Defekten der vakuolären Biogenese (Reihl & Stolz 2005), die denen der vps-Mutanten ähneln. Vps-Mutanten zeichneten sich durch eine erhöhte Sr-Anreicherung aus (siehe 4.4.1.1). Neben *mch5Δ* wurden auch *rib5Δ* und die Doppelmutanten *mch5Δrib5Δ* auf ihre Aufnahmeeigenschaften für Cs und Sr hin untersucht. Dabei zeigte *rib5Δ* und die Doppelmutante *mch5Δrib5Δ* ebenfalls eine erhöhte Sr-Anreicherung. Diese war in beiden Fällen jedoch stärker ausgeprägt als bei *mch5Δ* alleine (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des gleichen Phänotyps von *rib5Δ* und *mch5Δ* kann spekuliert werden, dass die Hefen zwar Riboflavin selbst synthetisieren können, die zusätzliche Aufnahme des Vitamins durch Mch5p jedoch ebenfalls wichtig ist, um einen ausreichenden Riboflavin-Spiegel in der Zelle aufrecht zu erhalten. Der Verlust des Transporters und somit der Riboflavin-Aufnahme aus dem Medium führt demnach höchstwahrscheinlich auch zu den oben beschriebenen Defekten in der Vakuolenbiogenese.

4.7 In der Analyse wurden bisher unbekannte Proteine identifiziert

Wie in Kapitel 3.6 bereits angesprochen wurden, sind in dieser Arbeit auch eine Reihe von bisher unbekanntem oder nicht charakterisierten Proteinen identifiziert worden. Auf drei dieser Kandidaten wird in den nächsten beiden Abschnitten genauer eingegangen. Zum einen zeigen alle drei Proteine potentielle Transmembran-Domänen, so dass sie unter Umständen direkt am Transport der Ionen beteiligt sind. Auf der anderen Seite konnten für diese Kandidaten einige Homologe in Pflanzen recherchiert werden. Der erste Kandidat, Ydr090cp, wurde in Abschnitt 3.9 näher charakterisiert. Die anderen beiden Proteine, Ygr125wp und Ydr089wp, zeigen eine Assoziation mit der Sr-Anreicherung, da die betreffenden Mutanten viel weniger akkumulieren als der Wildtyp.

4.7.1 Haben YGR125W und YDR089W eine Funktion in der Sr-Homöostase?

Das noch nicht charakterisierte Protein Ygr125wp zeigt starke Homologien zu Sulfattransportern in anderen Pilzen und in Pflanzen (z.B. *A. thaliana*) und ist in der Vakuole zu finden (siehe Anhang 1). Die Wirkung dieses Proteins auf die Sr-Anreicherung könnte indirekt sein, indem es eventuell negativ geladene „Gegenionen“ (SO_4^{2-}) in der Vakuole bereitstellt, die essentiell für den Eintransport von Kationen in die Vakuole sind. Ein direkter Transport von Sr und Ca könnte vielleicht auch durch Ygr125wp möglich sein. Eine weitere Möglichkeit, wie Ygr125wp in die Sr-Anreicherung involviert sein könnte, liefert die Interaktion des Proteins mit Sur2p (Miller et al. 2005). Sur2p hat eine Funktion in der Biosynthese von Sphingolipiden (Haak et al. 1997). Eine Verknüpfung der Sr-Anreicherung mit der Biosynthese von Lipiden konnte auch an anderen Mutanten dieser Studie festgestellt werden. Es konnte zum Beispiel der Verlust von Enzymen der Ergosterin-Biosynthese (Erg2p, Erg3p und Erg6p) mit einer erhöhten Sr-Anreicherung assoziiert werden. Im Falle von *ygr125wΔ* würde sich jedoch ein entgegengesetzter Phänotyp zu den *ergΔ*-Mutanten ergeben. Da es sich aber um unterschiedliche Lipidklassen handelt und Sphingolipide andere Funktionen in der Zelle erfüllen als Ergosterin, könnte dies die entgegengesetzten Effekte erklären.

Für das zweite, bisher nicht charakterisierte Protein, Ydr089wp, dessen Verlust ebenfalls zu einer verringerten Sr-Anreicherung führt, wurden ebenfalls Transmembrandomänen vorhergesagt. Ob es sich bei diesem Protein jedoch um einen Transporter handelt, ist bisher nicht bekannt. *Ydr089wΔ*-Zellen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Nickelkonzentrationen (Bishop et al. 2007). Daher ist eine Funktion in der Homöostase divalenter Kationen vorstellbar.

Beide Gene werden im Wildtyp exprimiert, allerdings führt die Präsenz von Sr (und Cs) zu keiner verstärkten Expression, wie es im Falle von YDR090C zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Die beiden Mutanten zeigen neben der verringerten Anreicherung von Sr (und Ca) keine weiteren Auffälligkeiten. Eine nähere Charakterisierung der Proteine, z.B. durch die Identifizierung seiner Substrate bzw. der Interaktionspartner in der Zelle, würden maßgeblich zur Aufklärung ihrer Funktion in der Ca-Homöostase beitragen.

4.7.2 Welche Funktion erfüllt YDR090C in der Zelle?

YDR090C ist ein bisher nicht charakterisiertes Gen der Hefe. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass YDR090C i) im Wildtyp exprimiert wird und ii) die Expression des Gens durch extrazellulär vorliegendes Cs induziert wird. Weiterhin konnte durch Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen und biochemischen Analysen zur Lokalisation abgeleitet werden, dass Ydr090cp in der Plasmamembran lokalisiert ist (siehe Abschnitt 3.9.4). Das Protein zeigt Homologien zu einem humanen Cystintransporter (CTNS), der den H⁺-gekoppelten Transport von Cystin (Disulfid des Cysteins) ermöglicht. In der Hefe ist bereits ein Cystintransporter (Ers1p) identifiziert (Gao et al. 2005), der jedoch keine Auffälligkeiten in der Cs-Anreicherung zeigte. Ers1p ist in der Membran des prävakuolären Kompartiments und der Vakuole lokalisiert und vermittelt den Transport von Cystin aus der Vakuole in das Cytoplasma. Im Cytoplasma kann das Cystin wieder zu Cystein reduziert werden. Die Sequenzhomologie zwischen Ers1p und Ydr090cp ist mit 13,9 % eher gering, so dass man nicht unbedingt von einer vergleichbaren Regulation oder Funktion beider Proteine ausgehen werden kann.

Anhand der vorliegenden Daten lassen sich klare Zusammenhänge zur Cs-Anreicherung in der Hefezellen herstellen: Die Mutante ydr090cΔ ist sensitiv gegenüber 100 mM CsCl, wohingegen eine Überexpression von YDR090C zu einer erhöhten Toleranz gegenüber dem Kation führt. Ebenso konnte durch die Komplementation der Mutante die Cs-Anreicherung wieder auf Wildtyp-Niveau reduziert werden. Folglich scheint Ydr090cp einen Einfluss auf die Cs-Anreicherung der Zelle zu besitzen. Dies könnte auf zwei Wegen erreicht werden: Entweder reguliert Ydr090cp die Cs-Aufnahme, wobei der Verlust von Ydr090cp in der Mutante zu einer erhöhten Cs-Anreicherung führt. Oder Ydr090cp ist direkt an der Ausschleusung von Cs beteiligt. Cs-Aufnahmeversuche mit verschiedenen K-Konzentrationen zeigten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp BY4741 und der Mutante (3.9.3). In beiden Stämmen wurde die Cs-Anreicherung vergleichbar stark gehemmt. Daher ist es wenig wahrscheinlich, dass Ydr090cp die Aufnahme von Cs beeinflusst. Bisher sind keine Interaktionspartner für Ydr090cp bekannt, die in der Ionenhomöostase eine Rolle spielen könnten und so eine indirekte Modifizierung der Cs-Aufnahme und -Abgabe ermöglichen würden. Die zweite Alternative für die Rolle von Ydr090c – eine aktive Ausschleusung von Cs aus der Zelle – wird durch die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran unterstützt. Zur genaueren Beurteilung der Funktion von Ydr090cp in der Hefezelle muss in weiterführenden Experimenten i) die Substratspezifität des putativen Transporters und ii) die Regulation in Abhängigkeit verschiedener Stressbedingungen geklärt werden. Ob Ydr090cp vielleicht ebenfalls ein Cystin-Transporter ist und inwieweit eine mögliche Aufnahme von extrazellulär vorliegendem Cystin physiologisch relevant ist, bleibt spekulativ. Arbeiten, die diese Aspekte näher beleuchten sollen, sind zu gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch nicht so weit fortgeschritten, um eine Aussage treffen zu können.

5. Zusammenfassung

Die Freisetzung von radioaktiven Stoffen durch die Nutzung der Kerntechnik erhöht die Strahlenbelastung des Menschen messbar. Radiocäsium und -strontium tragen merklich und vor allem lang anhaltend zur Kontamination der Umwelt und somit zur Belastung des Menschen bei. Aufgrund ihrer hohen Bioverfügbarkeit werden sie schnell nach ihrer Freisetzung in biologische Systeme inkorporiert und gelangen so in die Nahrung des Menschen. Eine Möglichkeit zur Reduzierung der menschlichen Strahlenexposition durch seine Lebensmittel besteht in der Verminderung der Isotopen-Anreicherung in Pflanzen, die die Grundlage unserer Nahrung darstellen. Dies kann zum einen durch Auswahl von Nutzpflanzen erfolgen, die in geringerem Umfang die Radionuklide ^{137}Cs und ^{90}Sr anreichern. Eine andere Alternative wäre die Manipulation der Pflanzen auf molekularer Ebene, um auf diese Weise „safe crops“ zu züchten, die weniger Cs und Sr aufnehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Cs/ ^{134}Cs - und Sr/ ^{85}Sr -Anreicherung in Hefe mit einem reversen, genetischen Ansatz untersucht, unter der Verwendung einer genomweiten Kollektion haploider Hefemutantenstämme ($n=4862$). Im Rahmen dieser Analyse wurden 212 Mutanten mit einer abweichenden Cs- und/oder Sr-Anreicherung assoziiert. Diese Mutanten waren für eine breite Palette von zellulären Funktionen defizient. Dabei waren Mutanten überrepräsentiert, die Defekte in der Vakuolenfunktion oder -biogenese sowie in der intrazellulären Proteinsortierung zeigten. In Zusammenhang mit diesen Defekten konnten zwei generelle Beobachtungen gemacht werden: Mutanten mit den beschriebenen Effekten wiesen i) eine reduzierte Cs-Akkumulation und/oder ii) eine drastisch erhöhte Sr-Anreicherung auf.

Weiterhin wurden mehrere Analysen durchgeführt, um die Akkumulation von Cs und Sr mit den essentiellen Elementen K und Ca zu vergleichen. Es wurden i) Aufnahmeversuche mit Ca/ ^{45}Ca und Rb/ ^{86}Rb durchgeführt und ii) der Ca- und K-Gehalt von Hefen bestimmt, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Anhand dieser Analysen konnten zwischen Cs und Rb bzw. K deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Akkumulation von Cs weicht in fast allen untersuchten Mutanten weitaus dramatischer vom Wildtyp-Verhalten ab als es für Rb der Fall war. Des Weiteren bestand nur eine schwache Korrelation zwischen dem K-Gehalt der Zelle und der Cs-Akkumulation. Für insgesamt sechs Mutanten (u.a. $\text{ydr090c}\Delta$, $\text{fcy2}\Delta$, $\text{fps1}\Delta$) konnten anhand aller Untersuchungen festgestellt werden, dass sie ausschließlich ein verändertes Verhalten für Cs zeigten. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Aufnahme und Anreicherung von Cs und K zumindest teilweise unterschiedlich reguliert oder vermittelt wird. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ist die Anreicherung von Sr und Ca in der Hefe stark korreliert, wodurch eine unterschiedliche Regulation ausgeschlossen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls mit der Charakterisierung einiger Kandidaten begonnen, von denen YDR090C vorgestellt wird. Erste Daten implizieren eine Funktion des Proteins im Efflux von Cs-Ionen aus der Hefezelle. Anhand genauerer Kenntnisse über diese Kandidaten ist es vielleicht möglich, die Cs-Aufnahme und -Anreicherung auf molekularer Ebene zu modifizieren.

6. Summary

The intentional or unintentional release of radioisotope due to the use of nuclear technology enhances the radioactive exposure of man noticeable. Radiocesium (^{137}Cs) and -strontium (^{90}Sr) are accountable for a large and especially long lasting contamination of the environment. Due to their high bioavailability they are transferred rapidly after their release to biotic systems and enter the food chain. The accident of Chernobyl is a well studied example, which gives insights into the distribution of both radio nuclides and their subsequent uptake by microorganism, plants and animals.

One important strategy to reduce man's radiation dose caused by ^{137}Cs and ^{90}Sr is to minimize the uptake of these radio nuclides by plants, as they are the basis of our food. For this purpose crops with a low radio nuclide uptake can be selected. To go a step further, it would be of great interest to identify single proteins associated with the radio nuclide uptake or accumulation and to manipulate these on molecular level. So, the breeding of "save crops" with modified uptake characteristics could be achieved.

The present study investigates the Cs and Sr accumulation in yeast with a reverse genetic approach using a whole collection of haploid yeast mutant strains ($n=4862$). According to this analysis, 212 mutant strains could be associated with a deviating Cs and/or Sr accumulation. The mutants were deficient for wide range of cellular processes. Most prominent aspects were vacuole function and biogenesis, followed by protein sorting and vesicle mediated transport. According to the effects of a deregulated protein sorting, two observations could be made: The Cs accumulation is drastically reduced in cells impaired in protein sorting and vacuole biogenesis while the Sr accumulation experienced a significant increase.

Several further analysis were undertaken to compare the accumulation of Cs and Sr with their essential counterparts potassium (K) and calcium (Ca). The accumulation of Ca was measured radioactively utilizing ^{45}Ca while the uptake and enrichment of K was monitored using rubidium (Rb) and his prominent isotope ^{86}Rb . Furthermore the cellular content of Ca and K were determined by ICP-OES in the wild type and mutant strains. Thereby the accumulation of Cs and Rb show noticeable differences— almost all the mutant strains exhibited a less pronounced deviation from the wild type Rb accumulation. Additionally, the mutants show only less correlation between a changed Cs accumulation and disturbances in cellular K level. Six mutants showed differences only for Cs accumulation while every other study revealed wild type character (e.g. *ydr090cΔ*, *fcy2Δ* and *fps1Δ*). All these results suggest that Cs uptake and accumulation is at least partially regulated or facilitated in a different way than K. In contrast to these results, Sr and Ca accumulation in yeast was highly correlated excluding the possibility of a differential regulation.

Whitin this work the characterization of some candidates was started and YDR090C was chosen as an example. First results suggest a function of the protein in the efflux of Cs ions from yeast cells. These findings are promising for future work which might deal with the manipulation of Cs accumulation on molecular level.

7. Literaturverzeichnis

- Absalom, J. P., Young, S. D., Crout, N. M., Sanchez, A., Wright, S. M., Smolders, E., Nisbet, A. F. und Gillett, A. G. (2001). "Predicting the transfer of radiocaesium from organic soils to plants using soil characteristics." *J Environ Radioact* **52**(1): 31-43.
- Aiking, H. und Tempest, D. W. (1977). "Rubidium as a probe for function and transport of potassium in the yeast *Candida utilis* NCYC 321, grown in chemostat culture." *Archives of Microbiology* **115**(2): 215-21.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, C. und Walter, P. (2003), *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH
- Andersen, M., Gwynn, J. P., Dowdall, M., Kovacs, K. M. und Lydersen, C. (2006). "Radiocaesium (¹³⁷Cs) in marine mammals from Svalbard, the Barents Sea and the North Greenland Sea." *Sci Total Environ* **363**(1-3): 87-94.
- Antebi, A. und Fink, G. R. (1992). "The yeast Ca²⁺-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution." *Mol Biol Cell* **3**(6): 633-54.
- Armstrong, W. M. und Rothstein, A. (1964). "Discrimination between Alkali Metal Cations by Yeast. I. Effect of pH on Uptake." *J Gen Physiol* **48**: 61-71.
- Armstrong, W. M. und Rothstein, A. (1967). "Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport." *J Gen Physiol* **50**(4): 967-88.
- Avery, S. V. (1995). "Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity." *J Ind Microbiol* **14**(2): 76-84.
- Avery, S. V. (1996). "Fate of caesium in the environment: Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems." *Journal of Environmental Radioactivity* **30**(2): 139-171.
- Avery, S. V., Gadd, G. M. und Codd, G. A. (1992). "Interactions of cyanobacteria and microalgae with caesium. In: Impact of Heavy Metals on the Environment." *Elsevier, Amsterdam*: 133-182.
- Avery, S. V. und Tobin, J. M. (1992). "Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl Environ Microbiol* **58**(12): 3883-9.
- Banuelos, M. A. und Rodriguez-Navarro, A. (1998). "P-type ATPases mediate sodium and potassium effluxes in *Schwanniomyces occidentalis*." *Journal of Biological Chemistry* **273**(3): 1640-6.
- Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. und Potier, S. (1998). "The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux." *Microbiology* **144**: 2749-58.
- Benito, B., Quintero, F. J. und Rodriguez-Navarro, A. (1997). "Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi." *Biochimica et Biophysica Acta* **1328**(2): 214-26.
- Bihler, H., Gaber, R. F., Slayman, C. L. und Bertl, A. (1999). "The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺-dependent, K⁺-independent current." *FEBS Letters* **447**(1): 115-20.
- Bihler, H., Slayman, C. L. und Bertl, A. (1998). "NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **432**(1-2): 59-64.
- Bishop, A. L., Rab, F. A., Sumner, E. R. und Avery, S. V. (2007). "Phenotypic heterogeneity can enhance rare-cell survival in 'stress-sensitive' yeast populations." *Molecular Microbiology* **63**(2): 507-20.
- BMU (2007) Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2007. *Bundesministerium für Umwelt*
- Borst-Pauwels, G. W. (1981). "Ion transport in yeast." *Biochimica et Biophysica Acta* **650**(2-3): 88-127.
- Borst-Pauwels, G. W. und Theuvenet, A. P. (1984). "Apparent saturation kinetics of divalent cation uptake in yeast caused by a reduction in the surface potential." *Biochimica et Biophysica Acta* **771**(2): 171-6.

- Bowers, K. und Stevens, T. H. (2005). "Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta* **1744**(3): 438-54.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J. D. (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." *Yeast* **14**(2): 115-32.
- Bryant, N. J. und Stevens, T. H. (1998). "Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(1): 230-47.
- Bugnicourt, A., Froissard, M., Sereti, K., Ulrich, H. D., Haguenaer-Tsapis, R. und Galan, J. M. (2004). "Antagonistic roles of ESCRT and Vps class C/HOPS complexes in the recycling of yeast membrane proteins." *Mol Biol Cell* **15**(9): 4203-14.
- Bukovac, M. J., Wittwer, S. H. und Tukey, H. B. (1965) Above ground plant parts as a pathway for entry of fission products into the food chain with special reference to 89-90 Sr and 137-Cs. *Raioactive fallout, Soils, Plants, Foods, Man. Elsevier Press*
- Bystrzejewska-Piotrowska, G. und Bazala, M. A. (2008). "A study of mechanisms responsible for incorporation of cesium and radiocesium into fruitbodies of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*)." *Journal of Environmental Radioactivity* **99**(7): 1185-1191.
- Camacho, M., Ramos, J. und Rodríguez-Navarro, A. (1981). "Potassium requirements of *Saccharomyces cerevisiae*." *Current Microbiology* **6**(5): 295-299.
- Carini, F. und Lombi, E. (1997). "Foliar and soil uptake of 134-Cs and 85-Sr by grape vines." *Sci Total Environ* **207**(2-3): 157-64.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. und Barton, G. J. (2004). "The Jalview Java alignment editor." *Bioinformatics* **20**(3): 426-7.
- Collander, R. (1941). "Selective Absorption of Cations by Higher Plants." *Plant Physiology (Rockville)* **16**(4): 691-720.
- Conibear, E. und Stevens, T. H. (1998). "Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast." *Biochimica et Biophysica Acta* **1404**(1-2): 211-30.
- Conway, E. J. und O'Malley, E. (1946). "The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02n-H ion." *Biochemical Journal* **40**(1): 59-67.
- Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. und Emr, S. D. (1997). "The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole." *Cell* **91**(1): 109-18.
- Craddock, C. P., Hunter, P. R., Szakacs, E., Hinz, G., Robinson, D. G. und Frigerio, L. (2008). "Lack of a vacuolar sorting receptor leads to non-specific missorting of soluble vacuolar proteins in *Arabidopsis* seeds." *Traffic* **9**(3): 408-16.
- Cronin, S. R., Rao, R. und Hampton, R. Y. (2002). "Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis." *Journal of Cell Biology* **157**(6): 1017-28.
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Ositelu, O. O., Beaudry, V., Knight, A., Nanfack, Y. F. und Cunningham, K. W. (2008). "Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast." *Cell Calcium*.
- Cunningham, K. W. und Fink, G. R. (1994a). "Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Experimental Biology* **196**: 157-66.
- Cunningham, K. W. und Fink, G. R. (1994b). "Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases." *Journal of Cell Biology* **124**(3): 351-63.
- Cunningham, K. W. und Fink, G. R. (1996). "Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* **16**(5): 2226-37.
- Denis, V. und Cyert, M. S. (2002). "Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue." *Journal of Cell Biology* **156**(1): 29-34.

- Derks, W. J. G. und Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1979). "Apparent Three-Site Kinetics of Cs⁺-Uptake by Yeast." *Physiologia Plantarum* **46**(3): 241-246.
- Dunn, T., Gable, K. und Beeler, T. (1994). "Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles." *Journal of Biological Chemistry* **269**(10): 7273-8.
- Ehlken, S. und Kirchner, G. (2002). "Environmental processes affecting plant root uptake of radioactive trace elements and variability of transfer factor data: a review." *Journal of Environmental Radioactivity* **58**(2-3): 97-112.
- Eide, D. J., Clark, S., Nair, T. M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M. L. und Harper, J. F. (2005). "Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genome Biol* **6**(9): R77.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. und Botstein, D. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Epstein, E. (1972). "Mineral nutrition of plants: principles and perspectives." *Wiley, New York*.
- Epstein, E. und Hagen, C. E. (1952). "A Kinetic Study of the Absorption of Alkali Cations by Barley Roots." *Plant Physiology (Rockville)* **27**(3): 457-74.
- Fischer, M., Schnell, N., Chattaway, J., Davies, P., Dixon, G. und Sanders, D. (1997). "The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating." *Febs Letters* **419**(2-3): 259-262.
- Fleishman, D. G., Nikiforov, V. A., Saulus, A. A. und Komov, V. T. (1994). "137Cs in fish of some lakes and rivers of the Bryansk region and north-west Russia in 1990-1992." *Journal of Environmental Radioactivity* **24**(2): 145-158.
- Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A. und Kurlandzka, A. (2005). "The functioning of mammalian CIC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p." *Biochemical Journal* **390**(Pt 3): 655-64.
- Forgac, M. (1998). "Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases." *FEBS Lett* **440**(3): 258-63.
- Forster, C. und Kane, P. M. (2000). "Cytosolic Ca²⁺ homeostasis is a constitutive function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **275**(49): 38245-53.
- Gao, X. D., Wang, J., Keppler-Ross, S. und Dean, N. (2005). "ERS1 encodes a functional homologue of the human lysosomal cystine transporter." *FEBS Journal* **272**(10): 2497-511.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Banuelos, M. A., Haro, R. und Rodriguez-Navarro, A. (1993). "Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and General Genetics* **236**(2-3): 363-8.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. und Herrero, E. (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **13**(9): 837-48.
- Gaxiola, R. A., Fink, G. R. und Hirschi, K. D. (2002). "Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters." *Plant Physiol* **129**(3): 967-73.
- Gerstmann, U. C. und Schimmack, W. (2006). "Soil-to-grain transfer of fallout 90Sr for 28 winter wheat cultivars." *Radiation and Environmental Biophysics* **45**(3): 187-94.
- Ghosh, A., Sharma, A. und Talukder, G. (1993). "Effects of cesium on cellular systems." *Biological Trace Element Research* **38**(2): 165-203.
- Gietz, R. D. und Woods, R. A. (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S. G. (1996). "Life with 6000 genes." *Science* **274**(5287): 546, 563-7.
- Grupen, C. (2008), Grundkurs im Strahlenschutz, *Springer Verlag*

- Haak, D., Gable, K., Beeler, T. und Dunn, T. (1997). "Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p." *J Biol Chem* **272**(47): 29704-10.
- Hakem, N., Al Mahamid, I., Apps, J. und Moridis, G. (2000). "Sorption of Cesium and Strontium on Hanford Soil." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **246**(2): 275-278.
- Hampton, C. R., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Hammond, J. P., Mead, A., Payne, K. A., Pritchard, J. und White, P. J. (2004). "Cesium toxicity in Arabidopsis." *Plant Physiol* **136**(3): 3824-37.
- Hampton, C. R., Broadley, M. R. und White, P. J. (2005). "Short review: the mechanisms of radiocaesium uptake by Arabidopsis roots." *Nukleonika* **50**.
- Haro, R., Garciadeblas, B. und Rodriguez-Navarro, A. (1991). "A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport." *FEBS Letters* **291**(2): 189-91.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F. und Rodriguez-Navarro, A. (1999). "Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular Microbiology* **31**(2): 511-20.
- Hauser, A. (2008). Molekulargenetische Grundlagen der Radiocäsium- und Radiostrontium-Akkumulation in *Arabidopsis thaliana*, Dissertation.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. und Tzagoloff, A. (1986). "Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites." *Yeast* **2**(3): 163-7.
- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H. und Kuno, T. (2003). "Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast." *Journal of Biological Chemistry* **278**(20): 18078-84.
- Hughes, M. N. und Poole, R. K. (1989). "Metals and Micro-organisms." *Chapman & Hall, London*.
- Hurley, J. H. (2008). "ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies." *Current Opinion in Cell Biology* **20**(1): 4-11.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Bretkreutz, B. J. und Tyers, M. (2002). "Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast." *Science* **297**(5580): 395-400.
- Jun, Y., Xu, H., Thorngren, N. und Wickner, W. (2007). "Sec18p and Vam7p remodel trans-SNARE complexes to permit a lipid-anchored R-SNARE to support yeast vacuole fusion." *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* **26**(24): 4935-45.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D. und Sychrova, H. (2006). "The Na⁺,K⁺/H⁺ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Research* **6**(5): 792-800.
- Komarov, E. und Bennett, B. G. (1983). "Selected Radionuclides." *WHO, Genf*.
- Koranda, J. J. und Robison, W. L. (1978). "Accumulation of radionuclides by plants as a monitor system." *Environmental Health Perspectives* **27**: 165-79.
- Krieger, H. (2004), Grundlagen der Strahlenphysik und des Strahlenschutzes, *Vieweg und Teubner Verlag*
- Kumar, A. und Snyder, M. (2001). "Emerging technologies in yeast genomics." *Nature Reviews Genetics* **2**(4): 302-12.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Leigh, R. A. und Jones, R. G. W. (1984). "A Hypothesis relating critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of this Ion in the Plant Cell." *New Phytologist* **97**(1): 1-13.
- Lerman, M. I., Spirin, A. S., Gavrilova, L. P. und Golov, V. F. (1966). "Studies on the structure of ribosomes. II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and the re-assembly of ribosome-like particles." *Journal of Molecular Biology* **15**(1): 268-81.

- Liang, H., Ko, C. H., Herman, T. und Gaber, R. F. (1998). "Trinucleotide insertions, deletions, and point mutations in glucose transporters confer K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* **18**(2): 926-35.
- Llinas, P., Masella, M., Stigbrand, T., Menez, A., Stura, E. A. und Le Du, M. H. (2006). "Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones." *Protein Science* **15**(7): 1691-700.
- Locke, E. G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y. und Cunningham, K. W. (2000). "A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast." *Molecular and Cellular Biology* **20**(18): 6686-94.
- Loukin, S. H. und Saimi, Y. (1999). "K²⁺-dependent composite gating of the yeast K²⁺ channel, Tok1." *Biophysical Journal* **77**(6): 3060-70.
- Madrid, R., Gomez, M. J., Ramos, J. und Rodriguez-Navarro, A. (1998). "Ectopic potassium uptake in trk1 trk2 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential." *Journal of Biological Chemistry* **273**(24): 14838-44.
- Martinez-Munoz, G. A. und Pena, A. (2005). "In situ study of K⁺ transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **22**(9): 689-704.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S. und Cunningham, K. W. (1997). "Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes & Development* **11**(24): 3445-58.
- Mensch+Umwelt (2006). "Strahlung", Neuherberg, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, ISSN 0949-0663: Seite 10-13
- Middleton, L. J. (1959). "Radioactive Strontium and Caesium in the Edible Parts of Crop Plants after Foliar Contamination." *International Journal of Radiation Biology* **1**: 387-402.
- Miller, A. J., Vogg, G. und Sanders, D. (1990). "Cytosolic calcium homeostasis in fungi: roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9348-52.
- Miller, J. P., Lo, R. S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W. S. und Fields, S. (2005). "Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12123-8.
- Miseta, A., Fu, L., Kellermayer, R., Buckley, J. und Bedwell, D. M. (1999a). "The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Delta vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **274**(9): 5939-47.
- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D. P., Fu, L. und Bedwell, D. M. (1999b). "The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*." *FEBS Lett* **451**(2): 132-6.
- Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. und Serrano, R. (1999). "A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3328-37.
- Navarre, C. und Goffeau, A. (2000). "Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane." *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* **19**(11): 2515-24.
- Nelson, H. und Nelson, N. (1990). "Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H²⁺-ATPase causes conditional lethality." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(9): 3503-7.
- Nelson, N. (2003). "A journey from mammals to yeast with vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase)." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**(4): 281-9.

- Nieuwenhuis, B. J., Weijers, C. A. und Borst-Pauwels, G. W. (1981). "Uptake and accumulation of Mn^{2+} and Sr^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta* **649**(1): 83-8.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K. und Robinson, L. C. (1997). "Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex." *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* **16**(14): 4194-204.
- Peiter, E., Fischer, M., Sidaway, K., Roberts, S. K. und Sanders, D. (2005). "The *Saccharomyces cerevisiae* Ca^{2+} channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity." *FEBS Lett* **579**(25): 5697-703.
- Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R. und Yenush, L. (2007). "Key role for intracellular K^+ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters." *Molecular and Cellular Biology* **27**(16): 5725-36.
- Perkins, J. und Gadd, G. M. (1993). "Caesium toxicity, accumulation and intracellular localization in yeasts." *Mycological Research* **97**(6): 717-724.
- Perzov, N., Nelson, H. und Nelson, N. (2000). "Altered distribution of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase as a feature of vacuolar H^+ -ATPase null mutants." *Journal of Biological Chemistry* **275**(51): 40088-95.
- Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H. und Nelson, N. (2002). "Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis." *Journal of Experimental Biology* **205**(Pt 9): 1209-19.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Membrane transport: retromer to the rescue." *Current Biology* **11**(3): R109-11.
- Phelan, J. P., Millson, S. H., Parker, P. J., Piper, P. W. und Cooke, F. T. (2006). "Fab1p and AP-1 are required for trafficking of endogenously ubiquitylated cargoes to the vacuole lumen in *S. cerevisiae*." *J Cell Sci* **119**(Pt 20): 4225-34.
- Pinson, B., Pillois, X., Brethes, D., Chevallier, J. und Napias, C. (1996). "In vivo phosphorylation of the purine/cytosine permease from the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *European Journal of Biochemistry* **239**(2): 439-44.
- Piper, R. C., Cooper, A. A., Yang, H. und Stevens, T. H. (1995). "VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Cell Biology* **131**(3): 603-17.
- Prista, C., Gonzalez-Hernandez, J. C., Ramos, J. und Loureiro-Dias, M. C. (2007). "Cloning and characterization of two K^+ transporters of *Debaryomyces hansenii*." *Microbiology* **153**(9): 3034-3043.
- Proft, M. und Struhl, K. (2004). "MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction." *Cell* **118**(3): 351-61.
- Prohl, G., Ehlik, S., Fiedler, I., Kirchner, G., Klemt, E. und Zibold, G. (2006). "Ecological half-lives of ^{90}Sr and ^{137}Cs in terrestrial and aquatic ecosystems." *J Environ Radioact* **91**(1-2): 41-72.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J. und Schachtman, D. P. (2008). "The high affinity K^+ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K^+ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*." *J Exp Bot* **59**(3): 595-607.
- Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Coria, R. und Pena, A. (1998). "A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+/H^+ exchanger." *Journal of Bacteriology* **180**(22): 5860-5.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R. und Rodriguez-Navarro, A. (1994). "TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* **176**(1): 249-52.
- Ramos, J. und Rodriguez-Navarro, A. (1986). "Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport." *European Journal of Biochemistry* **154**(2): 307-11.
- Reihl, P. und Stolz, J. (2005). "The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B2) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **280**(48): 39809-17.

- Rhodes, N., Morris, C. N., Ainsworth, S. und Kinderlerer, J. (1986). "The regulatory properties of yeast pyruvate kinase. Effects of NH_4^+ and K^+ concentrations." *Biochemical Journal* **234**(3): 705-15.
- Roberts, S. K., Fischer, M., Dixon, G. K. und Sanders, D. (1999). "Divalent cation block of inward currents and low-affinity K^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **181**(1): 291-7.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000). "Potassium transport in fungi and plants." *Biochim Biophys Acta* **1469**(1): 1-30.
- Rodriguez-Navarro, A. und Ramos, J. (1984). "Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* **159**(3): 940-5.
- Roller, A., Natura, G., Bihler, H., Slayman, C. L., Eing, C. und Bertl, A. (2005). "In the yeast potassium channel, Tok1p, the external ring of aspartate residues modulates both gating and conductance." *Pflügers Arch* **451**(2): 362-70.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I. und Moir, D. T. (1989). "The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca^{2+} ATPase family." *Cell* **58**(1): 133-45.
- Ruiz, A., Yenush, L. und Arino, J. (2003). "Regulation of ENA1 Na^{2+} -ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway." *Eukaryotic Cell* **2**(5): 937-48.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2000), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory
- Sazykina, T. G. (2000). "ECOMOD - An ecological approach to radioecological modelling." *Journal of Environmental Radioactivity* **50**(3): 207-220.
- Schimmack, W. und Bunzl, K. (1996). "Mobility of Chernobyl-derived Radiocesium in the Soil." *Ten Years Terrestrial Radioecological Research Following the Chernobyl Accident*, ed. A. S. S. Soc., Proc. Internat. Symposium on Radioecology. Wien,,: 11-16.
- Schimmack, W., Zimmermann, G., Sommer, M., Dietl, F., Schultz, W. und Paretzke, H. G. (2004). "Soil-to-grain transfer of fallout ^{137}Cs for 28 winter wheat cultivars as observed in field experiments." *Radiation and Environmental Biophysics* **42**(4): 275-84.
- Seaman, M. N. (2005). "Recycle your receptors with retromer." *Trends in Cell Biology* **15**(2): 68-75.
- Shaw, G. und Bell, J. N. B. (1989). "The Kinetics of Caesium absorption by roots of winter wheat and the possible consequences for the derivation of soil-to-plant transfer factors for radiocaesium." *Journal of Environmental Radioactivity* **10**: 213-231.
- Sheahan, J. J., Ribeiro-Neto, L. und Sussman, M. R. (1993). "Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **3**(5): 647-656.
- Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." *Methods Enzymol* **350**: 3-41.
- Simon, E., Barcelo, A. und Arino, J. (2003). "Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na^+/H^+ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle." *FEBS Letters* **545**(2-3): 239-45.
- Slayman, C. L., Long, W. S. und Lu, C. Y. (1973). "The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*." *Journal of Membrane Biology* **14**(4): 305-38.
- Stevens, T. H. und Forgac, M. (1997). "Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPase." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 779-808.
- Stevens, T. H., Rothman, J. H., Payne, G. S. und Schekman, R. (1986). "Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y." *Journal of Cell Biology* **102**(5): 1551-7.
- Strahlenschutzverordnung (2001) Verordnung für die Umsetzung von EURATOM-Richtlinien zum Strahlenschutz gültig ab 1. August 2001.
- Suelter, C. H. (1970). "Enzymes activated by monovalent cations." *Science* **168**(933): 789-95.
- Szerbin, P., Koblinger-Bokori, E., Koblinger, L., Vegvari, I. und Ugron, A. (1999). "Caesium-137 migration in Hungarian soils." *Science of the Total Environment* **227**(2-3): 215-27.

- Tamaki, H., Yun, C. W., Mizutani, T., Tsuzuki, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Kodama, Y., Shirahige, K. und Kumagai, H. (2005). "Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells* **10**(3): 193-206.
- Tamas, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B. A., Kilian, S. G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J. M. und Hohmann, S. (1999). "Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation." *Molecular Microbiology* **31**(4): 1087-104.
- Tamponnet, C., Martin-Garin, A., Gonze, M. A., Parekh, N., Vallejo, R., Sauras-Yera, T., Casadesus, J., Plassard, C., Staunton, S., Norden, M., Avila, R. und Shaw, G. (2008). "An overview of BORIS: Bioavailability of Radionuclides in Soils." *Journal of Environmental Radioactivity* **99**(5): 820-30.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A. J. und Igarashi, K. (2001). "Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast." *Biochemical Journal* **353**(Pt 3): 681-8.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1999). "Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast." *Journal of Biological Chemistry* **274**(6): 3265-7.
- Tyson, C. B., Lord, P. G. und Wheals, A. E. (1979). "Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate." *J Bacteriol* **138**(1): 92-8.
- Uemura, T., Tachihara, K., Tomitori, H., Kashiwagi, K. und Igarashi, K. (2005). "Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* **280**(10): 9646-52.
- Umemoto, N., Yoshihisa, T., Hirata, R. und Anraku, Y. (1990). "Roles of the VMA3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H²⁺-ATPase on vacuolar acidification and protein transport. A study with VMA3-disrupted mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **265**(30): 18447-53.
- UNSCEAR (1988). "Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 1988 Report to the General Assembly, with Annexes." New York, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
- UNSCEAR (2000) "Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly.", New York, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
- Valcke, E. und Cremers, A. (1994). "Sorption-desorption dynamics of radiocaesium in organic matter soils." *Science of the Total Environment* **157**: 275-283.
- Volkmer, M. (2007) "Radioaktivität und Strahlenschutz". *Informationskreis KernEnergie (www.kernenergie.de)*
- Volkov, A. G., Paula, S. und Deamer, D. W. (1997). "Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers." *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **42**(2): 153-160.
- Wada, Y. und Anraku, Y. (1992). "Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. VAM7, a gene for regulating morphogenic assembly of the vacuoles." *Journal of Biological Chemistry* **267**(26): 18671-5.
- Waegeneers, N., Smolders, E. und Merckx, R. (2005). "Modelling 137Cs uptake in plants from undisturbed soil monoliths." *J Environ Radioact* **81**(2-3): 187-99.
- White, P. J. (1998). "Calcium Channels in the Plasma Membrane of Root Cells." *Ann Bot* **81**(2): 173-183.
- White, P. J. (1999). "The molecular mechanism of sodium influx to root cells." *Trends in Plant Science* **4**(7): 245-246.
- White, P. J., Bowen, H. C., Demidchik, V., Nichols, C. und Davies, J. M. (2002). "Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1564**(2): 299-309.
- White, P. J. und Broadley, M. R. (2000). "Tansley Review No. 113. Mechanisms of caesium uptake by plants." *New Phytologist* **147**(2): 241-256.

- White, P. J. und Lemtiri-Chlieh, F. (1995). "Potassium currents across the plasma membrane of protoplasts derived from rye roots: a patch-clamp study." *Journal of Experimental Botany* **46**(5): 497-511.
- Williams, R. L. und Urbe, S. (2007). "The emerging shape of the ESCRT machinery." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 355-68.
- Winter, V. und Hauser, M. T. (2006). "Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes." *Trends in Plant Science* **11**(3): 115-23.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., et al (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* **285**(5429): 901-6.
- Wright, M. B., Ramos, J., Gomez, M. J., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G. und Gaber, R. F. (1997). "Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **272**(21): 13647-52.
- Wysocki, R., Chery, C. C., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, J. M. und Tamas, M. J. (2001). "The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular Microbiology* **40**(6): 1391-401.
- Xu, J., Li, H. D., Chen, L. Q., Wang, Y., Liu, L. L., He, L. und Wu, W. H. (2006). "A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis." *Cell* **125**(7): 1347-60.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A. und Kusano, T. (2006). "The polyamine spermine protects against high salt stress in Arabidopsis thaliana." *FEBS Letters* **580**(30): 6783-8.
- Yamaguchi, N., Seki, K., Komamura, M. und Kurishima, K. (2007). "Long-term mobility of fallout 90-Sr in ploughed soil, and 90-Sr uptake by wheat grain." *Sci Total Environ* **372**(2-3): 595-604.
- Yaver, D. S., Nelson, H., Nelson, N. und Klionsky, D. J. (1993). "Vacuolar ATPase mutants accumulate precursor proteins in a pre-vacuolar compartment." *Journal of Biological Chemistry* **268**(14): 10564-72.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J. und Serrano, R. (2005). "pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase." *Molecular and Cellular Biology* **25**(19): 8683-92.
- Zhao, F., Song, C. P., He, J. und Zhu, H. (2007). "Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities." *Plant Physiology (Rockville)* **145**(3): 1061-72.
- Zhu, Y. G. und Smolders, E. (2000). "Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application." *J Exp Bot* **51**(351): 1635-45.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tabelle 1.1 Wichtungsfaktoren verschiedener Strahlungsarten	3
Tabelle 1.2 Ionenradien monovalenter Kationen	7
Tabelle 2.1 Zusammen setzung eines Transformationsansatzes	24
Tabelle 2.2 Kinetik-Experiment	29
Tabelle 3.1 Zeitabhängige Aufnahme von Cs und Sr im Wildtyp BY4741	34
Tabelle 3.2 Aufteilung der identifizierten Mutanten in verschiedene Kategorien	38
Tabelle 3.3 Kandidaten mit entkoppelter Cs- und Rb-Anreicherung	46
Tabelle 3.4 Zusammenfassung aller Messungen mit den 212 Kandidatenstämmen	51-54
Tabelle 3.5 Zusammenfassung von Aufnahmedaten und Ionengehalt der vps-Mutanten Klasse E	56
Tabelle 3.6 Übersicht zu den Mutanten der Klasse A, B und D	58
Tabelle 3.7 Zusammenfassung der AP-1 und AP-3-Komplexe und assoziierter Faktoren	59
Tabelle 3.8 vma-Mutanten und der Mutanten für die Assemblierungsfaktoren	62
Tabelle 3.9 Tranportproteine, die mit der Cs/Sr-Anreicherung assoziiert sind	64

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abbildung 1.1 Strahlenbelastung der Bevölkerung in Deutschland	1
Abbildung 1.2 Vergleich α -, β - und γ -Strahlung	2
Abbildung 1.3 Strahlungsempfindlichkeit verschiedener Organe	3
Abbildung 1.4 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	4
Abbildung 1.5 Verbreitung von Radionukliden in der Umwelt	6
Abbildung 1.6 Zerfallschema für ^{137}Cs	7
Abbildung 1.7 Zerfallschema für ^{90}Sr	10
Abbildung 1.8 Vergleich von Hefe- und Pflanzenzelle	12
Abbildung 1.9 Kaliumtransportwege in der Hefe	14
Abbildung 1.10 Ca-Transport in <i>S. cerevisiae</i>	17
Abbildung 2.1: PCR-Zusammensetzung und Ablauf der PCR-Reaktionen	25
Abbildung 2.2: Zusammensetzung der Sequenzierreaktion und PCR-Protokoll	25
Abbildung 2.3 Energiespektrum einer $^{134}\text{Cs}/^{85}\text{Sr}$ -Probe	28
Abbildung 3.1 Toxizitätstest für CsCl und SrCl ₂	32
Abbildung 3.2 Zeitabhängigkeit der Cs- und Sr-Anreicherung im Wildtyp BY4741	33
Abbildung 3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Cs- und Sr-Aufnahme	35
Abbildung 3.4 Anreicherung und absolute zelluläre Cs- und Sr-Konzentration im Wildtyp BY4741	36
Abbildung 3.5 Verteilung der Mutanten anhand ihres Aufnahmeverhaltens	37
Abbildung 3.6 Überblick über die gesamte untersuchte Hefemutanten-Kollektion	38
Abbildung 3.7 Cs- und Sr-Anreicherung bei verschiedenen pH-Bedingungen	39
Abbildung 3.8 pH-Abhängigkeit der Cs- und Sr-Anreicherung der Kandidaten	41
Abbildung 3.9 Rb- und Cs-Anreicherung im Vergleich	44
Abbildung 3.10 K- und Ca-Gehalt von Mutanten mit einer gestörten Cs-Akkumulation	45
Abbildung 3.11 Korrelation zwischen Ca- und Sr-Anreicherung	47
Abbildung 3.12 K- und Ca-Gehalt von Mutanten mit einer gestörten Cs-Akkumulation	48
Abbildung 3.13 Überblick über Funktion und Lokalisation der identifizierten Genprodukte	49
Abbildung 3.14 Interaktionsnetzwerk der vps-Klasse E	56
Abbildung 3.15 Toxizitätstest mit Mutanten der ESCRT III-Untereinheiten	57
Abbildung 3.16 Interaktionsnetzwerk von Proteinen der vps-Klasse A, B und D	58
Abbildung 3.17 Interaktionsnetzwerk der beiden AP-Komplexe	59
Abbildung 3.18 Toxizitätstest der Mutanten für Untereinheiten der AP-Komplexe	60
Abbildung 3.19 Interaktionsnetzwerk der vma-Mutanten	62
Abbildung 3.20 Toxizitätstest für die vma-Mutanten	63
Abbildung 3.21 ydr090c Δ zeigt eine erhöhte Cs-Anreicherung	66
Abbildung 3.22 Der Einfluss von K und Ca auf die Cs-Anreicherung	67
Abbildung 3.23 Expression von YDR090C in BY4741	68
Abbildung 3.24 Komplementation der Mutante ydr090c Δ	69
Abbildung 3.25 Lokalisation von Ydr090cp in der Hefezelle	70
Abbildung 4.1 Proteinsortierung in der Hefezelle	79
Abbildung 4.2 Defekte in der Protein-sortierung in vps-Mutanten der Klasse E	80

10. Anhang

Analyse aller 212 Kandidaten mit FunSpec

k: Anzahl der eingegebenen Gene, die in eine Kategorie fallen

f: Anzahl aller Gene in einer Kategorie

Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der das erhaltene Ergebnis durch Zufall generiert werden könnte.

MIPS Funktionelle Klassifizierung (459 Kategorien)

Kategorie	p-Wert	In der Kategorie vertreten	k	f
vacuolar/lysosomal transport [20.09.13]	<1e-14	VPS8 VMA2 STP22 TFP1 NHX1 VPS72 VPS3 CUP5 VMA8 PMC1 VAM7 VPS29 VPS35 DID4 VPS24 VMA5 APL2 LST4 VPS1 DID2 SNF7 SRN2 APS1 VPS38 VPS36 YPT7 STV1 VPS20 ATG2 MON2 VPS27 PEP12 VAM3 VPH1 VMA4 VTC3 VPS28 ATG5 TFP3 APM1 APL4 VPS4	42	153
homeostasis of protons [34.01.01.03]	2,15E-11	VMA2 TFP1 RAV2 NHX1 CUP5 VMA8 PPA1 VMA22 KHA1 RAV1 VMA5 VPH2 NHA1 STV1 VPH1 VMA4 TFP3	17	47
cation transport (H+, Na+, K+, Ca2+, NH4+, etc.) [20.01.01.01]	2,12E-08	VMA2 TFP1 PMP3 NHX1 CUP5 SPF1 VMA8 PMC1 PPA1 KHA1 TRK1 VMA5 NHA1 STV1 VPH1 VMA4 TFP3	17	68
protein targeting, sorting and translocation [14.04]	3,78E-06	VPS8 STP22 MSN5 VPS72 VPS3 CUP5 GOS1 VPS29 SEC28 VPS35 DID4 VPS24 NUP120 LST4 VPS1 DID2 SNF7 SRN2 VPS38 VPS36 ATG2 MON2 VPS27 PEP12 VPS17 VPH1 VPS28 ATG5 APM1 VPS4	30	281
transport ATPases [20.03.22]	6,98E-05	VMA2 TFP1 CUP5 SPF1 VMA8 PMC1 PPA1 VMA5 STV1 VPH1 VMA4 TFP3	12	53
vacuole or lysosome [42.25]	8,31E-05	VAM6 DOA4 VPS41 RAV2 CUP5 VAM7 VPS29 VAM10 VTC3 ATG5 VPS4	11	44
endocytosis [20.09.18.09.01]	2,47E-04	EDE1 RVS161 DOA4 SAC6 CUP5 CAP2 RCY1 YPK1 ENT4 VRP1 JJJ1 INP53	12	59
vesicular transport (Golgi network, etc.) [20.09.07]	2,35E-03	VPS54 NHX1 APL6 VPS29 APS3 LST4 YPT6 CHS5 YPT7 VPS17 APL5 APM1	12	72
cellular import [20.09.18]	4,68E-03	GCS1 FCY2 APL6 APS3 TRK1 GEF1 APL2 FPS1 APS1 YPT7 APL5 APL4 CTR1	13	90
intra Golgi transport [20.09.07.05]	6,64E-03	ARF1 GOS1 VPS35 DID4 VPS1 VPS36 VPS27 VPS4	8	33
assembly of protein complexes [14.10]	1,72E-02	ARF1 VPS41 TOM1 VPS3 VMA21 VMA22 IST3 RTT101 VMA5 VPH2 APL2 ENT4 APS1 CAC2 VAM3 VPH1 VMA4 TFP3 APL4	19	199
electron transport [20.01.15]	0.0002841	VMA2 TFP1 CUP5 VMA8 PPA1 VMA5 STV1 VPH1 VMA4 TFP3	10	83
budding, cell polarity and filament formation [43.01.03.05]	0.004972	RXT2 BEM1 RVS161 BUD23 SAC6 SNF1 CAP2 RCY1 HOC1 RHO4 ENT4 BUD20 CHS5 VRP1 ROM2 SUR4 ATG17 WHI3 CLA4	19	312
ribosomal proteins [12.01.01]	0.005237	RPL19B RPS11B RPS29B RPS16B RPP1B RPS24B RPL16A RPL40B RPS22B RPS10B RPL9B RPL16B RPS19B RPS7A RPS28A RPL21B	16	246
protein binding [16.01]	0.006566	BEM1 STP22 RVS161 GCS1 SAC6 MSN5 TOM1 SNF1 PAC10 VMA22 CAP2 RTT101 PFD1 RCY1 DID4 APL2 ENT4 APS1 VRP1 VPS27 APM1 APL4	22	391
autoproteolytic processing [14.07.11.01]	0.00872	ATG14 ATG17 ATG2 ATG5	4	26
enzyme mediated signal transduction [30.01.05]	0.009536	SNF1 NPR1	2	5

MIPS Subzelluläre Lokalisierung (48 Kategorien)

Kategorie	p-Wert	In der Kategorie vertreten	k	f
vacuole [770]	1,09E-06	VMA2 VAM6 TFP1 VPS41 VPS3 CUP5 VMA8 FCY2 PMC1 VAM7 VMA21 YGR125W PPA1 VPS35 DID4 VMA5 DID2 FPS1 SNF7 ATG17 VPS27 PEP12 VAM3 VPH1 VMA4 VTC3 ATG5 TFP3	28	235
vacuolar membrane [770.01]	1.2e-09	VMA2 VAM6 TFP1 VPS41 CUP5 VMA8 PMC1 VAM7 PPA1 VPS35 VMA5 VPS20 MAM3 PEP12 VAM3 VPH1 VMA4 VTC3 ATG5 TFP3	20	122
endosome [765]	2,02E-05	VPS8 DOA4 NHX1 VPS35 DID4 VPS24 VPS1 DID2 SNF7 VPS38 VPS20 VPS27 VPS17 VPS4	14	68
golgi-ER transport vesicles [745.03]	5,16E-02	ARF1 VPS54 APL6 SEC28 APS3 MTC1 STV1 MON2 APL5 APM1	10	68
golgi [740]	0.0001503	ARF1 VPS54 APL6 GOS1 VPS29 SEC28 MTC1 VPS35 HOC1 VPS1 YPT6 CHS5 ATG17 STV1	14	141
golgi-vacuole transport vesicles [745.09]	0.002319	ARF1 APL2 APS1 CHS5 STV1 APM1 APL4	7	58

MIPS Protein Komplexe (1142 Kategorien)

Kategorie	p-Wert	In der Kategorie vertreten	k	f
H ⁺ -transporting ATPase, vacuolar [220]	8,03E-10	VMA2 TFP1 CUP5 VMA8 PPA1 VMA5 STV1 VPH1 VMA4 TFP3	10	14
Complex Number 45, probably intermediate and energy metabolism [550.1.45]	9,13E-06	VMA2 TFP1 VMA8 RAV1 VMA5 VPH1 VMA4	7	11
AP-1 complex [260.20.10]	1,01E-03	APL2 APS1 APM1 APL4	4	4
Vps4p ATPase complex (Vps protein complex) [260.70]	3,22E-02	VPS24 SNF7 VPS4	3	3
Complex Number 84, probably membrane biogenesis and traffic [550.1.84]	3,29E-02	APL2 APS1 APM1 APL4	4	7
cytoplasmic ribosomal small subunit [500.40.20]	6,95E-02	RPS11B RPS29B RPS16B RPS24B RPS22B RPS10B RPS19B RPS7A RPS28A	9	57
AP-3 complex [260.20.30]	0.0001257	APL6 APS3 APL5	3	4
ER assembly complex [90.30]	0.001016	VMA22 VPH2	2	2
Vacuolar assembly complex [90.20]	0.001016	VAM6 VPS41	2	2
Complex Number 66, probably membrane biogenesis and traffic [550.1.66]	0.001016	VPS29 VPS35	2	2
Vam3/Vam7 vacuolar t-SNARE complex [260.50.10.10]	0.001016	VAM7 VAM3	2	2
26S proteasome [360.10]	0.002985	DOA4 YTA7	2	3
Complex Number 173, probably signalling [550.1.173]	0.002985	ATG14 TFP1	2	3
Vps35/Vps29/Vps26 complex [260.30.30.10]	0.002985	VPS29 VPS35	2	3
Complex Number 78, probably membrane biogenesis and traffic [550.1.78]	0.003269	APL6 APS3 APL5	3	10
Complex Number 77, probably membrane biogenesis and traffic [550.1.77]	0.003269	VPS8 VAM6 VPS41	3	10
Complex Number 402 [550.2.402]	0.005716	YPT7 JJJ1 GPH1	3	12
Complex Number 9, Mtr4 (3) [550.3.9]	0.005844	PAP2 RRP6	2	4
Complex Number 42, probably intermediate and energy metabolism [550.1.42]	0.007258	DOA4 PDA1 APM1	3	13
Actin-associated proteins [140.20.20]	0.007564	BEM1 SAC6 CAP2 VRP1	4	25
Complex Number 341 [550.2.341]	0.007793	ARF1 SCP160 VMA5 TEF4 ERG6 VMA4	6	55

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Paretzke danke ich recht herzlich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und sein Interesse an meiner Arbeit.

Mein besondere Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Durner und Herrn Prof. Dr. K. Schneitz für die Vertretung meiner Arbeit an der TU München. Herrn Prof. Dr. A. Gierl danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank Frau PD Dr. Katharina Schneider, die leider im September 2007 verstarb und Frau Dr. Ulrike Kanter, die meine Arbeit am Institut für Strahlenschutz betreuten und immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft, ihre freundliche Hilfe sowie ihre äußerst fachkundige Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Radioökologie möchte ich recht herzlich für die fabelhafte Zusammenarbeit, die guten Ratschläge und Anregungen und nicht zuletzt für die schöne Zeit am ISS danken: insbesondere Herrn Dr. J. Tschiersch, Herrn Dr. U. Gerstmann, Wolfgang Schultz, Monika Röhmuß und Rainer Lindner und allen anderen, die mir hoffentlich nicht böse sind, wenn ich sie hier nicht namentlich erwähne.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. A. Schäffner für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und die vielen hilfreiche Tipps und Denkanstöße, die zur weiteren Verbesserung der Arbeit beigetragen haben.

Weiterem Dank gilt Herr Prof. Dr. J. Adamski, durch dessen Großzügigkeit die Hefemutanten-Kollektion für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mit bei Herrn Univ.-Doz. Dr. B. Michalke und Herrn A. Grill für die tatkräftige Unterstützung bei den ICP-OES-Messungen sowie bei Herrn Dr. N. Klopp, der immer zu vor Ort war, wenn wieder einmal Oligo-Notstand oder Verwirrung mit den Sequenzierungen herrschte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich immer unterstützte und vor allem meinem Mann. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und war stets zur rechten Zeit mit konstruktiven Ratschlägen und Aufmunterungsversuchen zur Stelle.

12. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Sabine Heuck (geb. Hartung)
Geburtstag	24.09.1981
Geburtsort	Arnstadt/Thüringen
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Studium und Promotion

seit 11/2005	Promotion an der TU München / Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz Thema: <i>„Analyse der Cäsium- und Strontiumaufnahme in Saccharomyces cerevisiae unter Verwendung einer genomweiten, haploiden Mutantenkollektion“</i>
10/2004 – 06/2005	Diplomarbeit am Fritz Lippmann Institut-Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Grosse)
10/2000 – 10/2005	Studium der Biochemie/Molekularbiologie (Diplom) an der Friedrich Schiller Universität Jena

Schulbildung

09/1992 – 07/2000	Lyonel Feininger Gymnasium, Mellingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
04/1990 – 07/1992	Grundschule Mellingen, Mellingen
09/1988 – 03/1990	POS Ernst-Thälmann, Ehringsdorf/Weimar

Veröffentlichungen und Posterbeiträge

Soe, K., Hartung, S. und Grosse, F. (2006). "Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1): 178-85

Hartung, S., Röhmuß, M., Schneider, K. (2007). „Identification and characterization of gene products involved in uptake of radiocesium and –strontium in yeast as a model system.“ *6th Transport Colloquium*, Rauschholzhausen

Hartung, S., Röhmuß, M., Schneider, K. (2006). „Identification and characterization of gene products involved in uptake of radiocesium and –strontium in yeast as a model system.“ *24th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Prag