

Untersuchung von Metacaspasen in der Hefe

*Saccharomyces cerevisiae*

**Dissertation**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**2004**

vorgelegt von

**Alexander Szallies**

Tag der mündlichen Prüfung (Rigorosum): 21.5.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Dodt

Berichte aus der Biologie

**Alexander Szallies**

**Untersuchung von Metacaspasen in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae***

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Shaker Verlag  
Aachen 2004

### **Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2004

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-3364-4

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen  
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9  
Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

meinem Sohn Richard zum Gedenken († 12.10.2003)



## **Danksagung**

Die hier vorliegende Arbeit entstand am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Professor Dr. Michael Duszenko. Ich habe mich besonders bei diesem meinen Doktorvater für die Gelegenheit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe zu bedanken. Natürlich auch den Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe selbst, mit denen trotz verschiedener Themenstellungen sich fruchtbare Zusammenarbeit ergab, was nicht nur unsere Arbeit vorantrieb, sondern auch Spaß machte. Hier wären in erster Linie meine Doktorandenkollegen zu nennen Xuedong Kang, Uta Rheinweiler, Diana Mhonda, Nestor Uzcategui und Marc Rawer aber ebenso „meine“ Diplomanden Katharina Steinborn und Holger Mielenz.

Für biologisches Material und Unterstützung in Methoden oder für Literaturhinweise möchte ich mich herzlich bei den Herren Prof. Bohley, Dr. Hartmut Echner, Prof. Kai-Uwe Fröhlich, Dr. Frank Gaunitz, Prof. Stefan Jentsch, Dr. Bruno Kubata, Dr. Thomas Kupke, Dr. Martin Ligr, Dr. Frank Madeo, Dr. Florian Meyer und Dr. Wolfgang Schwarz.

Frau Prof. Gabriele Dodt danke ich für die Übernahme der Co-Berichterstattung.

Herrn Prof. Dieter Mecke möchte ich für die Vermittlung eines temporären Laborplatzes im „Verfügungsgebäude“ danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat.



Wenn wir in so zahlreichen Fällen die Wahrnehmung machen, daß große und wichtige Probleme bei der Nachprüfung sich als Scheinprobleme entpuppen, ja, daß das Wort »Wirklichkeit« manchmal einen ganz verschiedenen Sinn hat, je nachdem, ob der Standpunkt der Betrachtung gewählt wird, kommt dann nicht unsere wissenschaftliche Erkenntnis auf einen flachen Relativismus hinaus? Gibt es denn überhaupt kein absolut gültiges Urteil, keine absolute Wirklichkeit, unabhängig von irgendeinem besonderen Standpunkt ? [...] Nein, wohl gibt es in der Wissenschaft auch absolut richtige und endgültige Sätze, ebenso wie es in der Ethik absolute Werte gibt, und, was die Hauptsache ist, gerade diese Sätze und diese Werte sind die wichtigsten und erstrebenswertesten von allen. [...] Diese absoluten Werte in Wissenschaft und Ethik sind es, denen zuzustreben die eigentliche Aufgabe eines jeden geistig regsamen Menschen ausmacht...

Max Planck, „Scheinprobleme der Wissenschaft“, Vortrag vor dem Physikalischen Institut der Universität Göttingen am 17.7.1946.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG</b>	1
Proteolyse - ein zentraler regulatorischer Mechanismus für die Zelle	2
Das Ubiquitin-System	3
Die E3 Ubiquitin-Ligase Rsp5	5
Nicht-proteasomale Proteolyse	6
Die Caspasen - „Selbstmord“ der Zelle	7
Homologe der Caspasen	9
Verbreitung von Zelltodmechanismen außerhalb der Metazoen?	10
Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als eukaryontischer Modell- und Testorganismus	12
<i>Trypanosoma brucei</i> , ein Parasit im Blut von Wirbeltieren	12
Zielsetzung dieser Arbeit	14
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	15
Material	15
Biologisches Material	15
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Trypanosoma brucei</i>	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Medien	16
Vollmedium für <i>E. coli</i> (LB)	16
Transformationsmedium für <i>E. coli</i> (TSS)	16
Halbsynthetisches Medium für <i>T. brucei</i>	16
Vollmedium für <i>S. cerevisiae</i> (YPD)	17
Synthetisches Vollmedium für <i>S. cerevisiae</i> (CM)	17
Puffer	18
Oligonukleotide	18
Primer zum Amplifizieren von Hefe-ORFs	18
Primer für Gensequenzen von <i>T. brucei</i> und <i>S. pombe</i>	21
Mutagenese-Primer	22

Inhaltsverzeichnis.....	II
Mutagenese-Primer für <i>MCA1</i>	22
Primer für Genfusionen und -verkürzungen	24
Primer für Reportergene	25
Primer zum Amplifizieren von 5´- und 3´-Regionen von cDNAs	26
Primer zur Ermittlung der Orientierung von Fragmenten	26
Ausgangs-Plasmide	26
Konstruktion der Expressionsplasmide	27
Geräte	32
Methoden	33
Kulturführungen	33
<i>Escherichia coli</i>	33
Kompetente Zellen	33
Transformation	33
<i>Trypanosoma brucei</i>	34
Kultur der Blutstromformen <i>in vivo</i>	34
Kultur der Blutstromformen <i>in vitro</i>	34
Kultur der prozyklischen Form <i>in vitro</i>	35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Wachstums	35
Transformation von Hefe mit der Lithium-Methode	35
Isolierung von Nukleinsäuren	36
Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse	36
Plasmidisolierung aus Hefe	36
Isolierung von genomischer DNA aus Hefe	37
Phenolextraktion von RNA aus Hefe oder Trypanosomen	37
Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	38
Standard DNA-Gelelektrophorese	38
Präparative DNA-Gelelektrophorese	38
RNA-Gelelektrophorese	38
Manipulation von DNA	39
Ausfällen von DNA	39
Phosphorylierung von 5´-Enden	39

Inhaltsverzeichnis.....	III
Dephosphorylierung von 5´-Enden	39
Restriktionsverdau	39
Glätten von Enden	40
Rekombination von DNA durch Ligation	40
Polymerase-Kettenreaktion	40
Mutagenese und Rekombination durch PCR	41
Reverse Transkription	41
Mikroskopie	42
Bioinformatische Methoden	42
Sequenzabgleiche ( <i>Alignment</i> )	42
Sekundärstrukturen und Strukturmotive in Proteinsequenzen	42
<b>ERGEBNISSE</b>	43
Entdeckung der Metacaspasen als potentielle Cysteinpeptidasen	43
Klonierung der Gene der fünf Metacaspasen von <i>Trypanosoma brucei</i>	43
Verbreitung der Metacaspasen und Sequenzanalyse	44
Funktionelle Analyse der <i>Trypanosoma</i> -Metacaspasen in der Hefe	46
Effekte der <i>TbMCA4</i> Expression auf Hefe	47
Unabhängigkeit der <i>TbMCA4</i> -Effekte in Bezug auf Hefe-endogene Zelltod-Mechanismen	49
Expression heterologer Metacaspasen ohne offensichtliche Wirkung auf die Hefe	50
Überexpression und Deletion der Hefe-Metacaspase <i>MCA1</i>	51
Interaktion von <i>MCA1</i> mit <i>WWM1</i>	52
Suppression von <i>WWM1</i> durch <i>MCA1</i> ist abhängig vom N-Terminus von Mca1	56
<i>MCA1</i> supprimiert <i>WWM1</i> durch katalytische Aktivität von Mca1	57
Intrazelluläre Lokalisation von Mca1	59
Untersuchung von Wwm1- und Mca1-Reportern unter Kontrolle ihrer eigenen Promotoren	62
Wechselwirkung von <i>WWM1</i> mit <i>RSP5</i>	64
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> mit <i>MCA1</i> und deren Abhängigkeit	

Inhaltsverzeichnis.....	IV
von <i>WWM1</i>	68
Die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Rsp5 bedingt die Wechselwirkung von <i>RSP5</i> mit <i>WWM1</i>	71
<i>RBP1</i> , die große Untereinheit der RNA-Polymerase II, supprimiert sowohl <i>rsp5-1</i> als auch <i>RSP5</i>	73
Interaktion von <i>WWM1</i> mit <i>SEC31</i>	74
Suche nach weiteren Suppressoren von <i>WWM1</i> und <i>RSP5</i>	76
<i>PIN3</i> und <i>LSB1</i> als Suppressoren von <i>WWM1</i> und <i>RSP5</i>	77
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> mit <i>PQY1</i> und von <i>WWM1</i> mit <i>PQY2</i>	82
Die integralen Membranproteine Ynl305c und Yor161c supprimierten <i>RSP5</i>	84
<b>DISKUSSION</b>	87
Abstammung und Systematik der Metacaspasen	87
Die katalytische Aktivität der Metacaspasen	88
Metacaspasen und programmierter Zelltod	91
Intrazelluläre Lokalisation der Metacaspase Mca1	93
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> mit <i>WWM1</i>	94
Wechselwirkung von <i>MCA1</i> mit <i>WWM1</i> und <i>RSP5</i>	96
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> und <i>WWM1</i> mit <i>PIN3</i> und <i>LSB1</i>	98
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> und <i>WWM1</i> mit <i>PQY1</i> und <i>PQY2</i>	100
Wechselwirkung von <i>RSP5</i> mit <i>YOR161C</i> und <i>YNL305C</i>	101
Der Mechanismus zur Suppression von <i>RSP5</i>	102
Ein Rsp5-Ubiquitin-Ligase-Netzwerk	105
Ausblick	108
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	109
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	111
<b>GEN- UND PROTEIN-NOMENKLATUR</b>	113

Inhaltsverzeichnis.....	V
<b>LITERATUR</b>	114
<b>AKADEMISCHE LEHRER / LEBENSLAUF</b>	137