

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Andreas Knödler

aus: Pforzheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Expressionsregulation der Sac1 Lipidphosphatase in
Saccharomyces cerevisiae

Gutachter: PD Dr. Peter Mayinger

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. P. Mayinger für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas und die Möglichkeit, die Arbeit in den USA durchzuführen. Besonders hervorzuheben sind auch seine kompetente Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und das unermüdliche Korrekturlesen. Auch sein Humor und seine immerwährende gute Laune haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Bernhard Dobberstein für die Übernahme des zweiten Gutachtens und seine Hilfsbereitschaft in Prüfungsangelegenheiten aller Art danken.

Meinen Kollegen Frank Faulhammer, Ben Brankatschk, Fei Ying Cheong, Anastasia Blagoveshchenskaya, und Suparna Kanjilal danke ich für die jederzeit herzliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit. Die regelmäßigen "lunch-breaks" werden unvergessen bleiben.

Mein Dank gilt auch den Laboren von David Ellison, Teresa Nicolson, Peter Gillespie und Richard Walker, deren Materialien und Laborgeräte eine wertvolle Ergänzung darstellten.

Meinen Eltern und meinem Bruder bin ich unendlich dankbar für die jahrelange ununterbrochene Unterstützung, für ihre Aufmunterungen und ihren Rückhalt. Euer Verständnis und euer Glaube an mich hat mich jederzeit vorangetrieben. Jeder Besuch in der Wärme und Geborgenheit bei euch zu Hause ist ein Höhepunkt gewesen von dem ich monatelang zehren konnte. Das Gefühl, einen sicheren Hafen zu haben, den man jederzeit ansteuern kann, ist unersetzbar. Danke!

Zu guter Letzt geht mein Dank an eine weitere unersetzbar gewordene Stütze in meinem Leben. Susi, du bist in den letzten Jahren ein wertvoller Partner in allen Lebenslagen geworden. Du hast jederzeit Verständnis gezeigt und mich immer nach besten Kräften unterstützt. Unsere Liebe ist zu meinem Fels in der Brandung geworden. Ohne dich wären die letzten Wochen unlängst schwerer und vor allem langweiliger gewesen.

Zusammenfassung

Phosphoinositide sind wichtige Lipidsignalmoleküle, die an der Regulation vieler intrazellulärer Vorgänge beteiligt sind. Sie werden durch das Zusammenspiel von spezifischen Lipidkinasen und Lipidphosphatasen reguliert, die selbst einer genauen Regulation unterliegen müssen. Die Lipidphosphatase Sac1p in Hefe kann PtdIns(4)P-Signale an Membranen des ER und Golgi-Apparates hydrolysieren. Dabei wird die räumliche Regulation und Koordination der katalytischen Aktivität von Sac1p durch einen Lokalisationswechsel zwischen ER und Golgi-Apparat gewährleistet. Außerdem wurde beobachtet, dass eine Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet. So waren zelluläre Menge einer *sac1*-Variante mit reduzierter Phosphataseaktivität im Vergleich zu Wildtyp-Sac1p erhöht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expressionskontrolle von *SAC1* durch genetische und funktionelle Analysen untersucht.

Mit Hilfe von verkürzten und mutierten Promotorkonstrukten konnte eine Region innerhalb des *SAC1*-Promotors identifiziert werden, die für die Transkription essentiell ist. So wurde gezeigt, dass die Deletion der Basen -100 bis -92 stromaufwärts des *SAC1*-Startcodons innerhalb des Gesamtlängepromotors zum Verlust der transkriptionellen Aktivität führt. Die Sequenz dieser essentiellen Region lautet ACCAGAGGT. Die jeweils äußeren drei Basen bilden dabei eine palindromartige Struktur aus. Mit Gelshiftanalysen konnte nachgewiesen werden, dass an die intakte Basensequenz ein bisher unbekannter Proteinfaktor bindet. Werden die jeweils äußeren drei Basenpaare deletiert, wird die Bindung des Proteinfaktors weitestgehend unterbunden. Wurden Oligonukleotide, die die spezifische Sequenz enthielten, an CNBr-Sepahrose gekoppelt, so war man in der Lage, spezifisch bindende Proteine in solchen Mengen aufzureinigen, die massenspektrometrischen Sequenzanalysen genügten. Jedoch konnte der bindende Faktor nicht identifiziert werden.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der *SAC1*-Promotor inositol sensitiv ist. Unter Inositolmangelbedingungen war die Promotoraktivität erhöht, Inositolüberschuss hatte eine Erniedrigung der Aktivität zur Folge. Zusammen mit dem bekannten Phänotypen der Inositolauxotrophie einer *sac1* Δ -Mutante, stellt dies einen Hinweis dar, dass die Expressionsregulation von *SAC1* mit dem Lipidstoffwechsel gekoppelt ist. Die Analyse der *SAC1*-Expression im Zusammenhang mit der Regulation von Genen der Inositolbiosynthese hat jedoch ergeben, dass Inositol nicht das direkte Signal ist, welches die Promotoraktivität reguliert.

Es konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Aktivität des *SAC1*-Promotors mit der intrazellulären PtdIns(4)P-Menge korreliert. So war der Promotor in *sac1* Δ -Zellen, die durch zehnfach erhöhte PtdIns(4)P-Mengen charakterisiert wurden, deutlich aktiver. Wurden die *sac1* Δ -Zellen mit temperatursensitiven Lipidkinasemutanten kombiniert, so sank die Aktivität des Promotors entsprechend der Reduktion von intrazellulärem PtdIns(4)P. Damit war ein Hinweis gefunden, dass intrazelluläres PtdIns(4)P das Signal sein könnte, das die Promotoraktivität von *SAC1* steuert. Möglicherweise wird das Lipidsignal über spezifische lipidbindende Proteine von der Membran in den Nukleus transportiert. Mit Hilfe von biotinylierten, PtdIns(4)P-enthaltenden Liposomen konnte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, nach PtdIns(4)P-interagierenden Faktoren zu suchen. Diese Methode kann nicht nur für die Charakterisierung der Bindeeigenschaften lipidbindender Proteine eingesetzt werden, sondern auch für die Aufreinigung von Proteinmengen, die für eine Detektion durch Coomassiefärbung ausreichend sind. Durch weitere Aufskalierungen sollte man in der Lage sein, auch weniger abundante Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit PtdIns(4)P interagieren können.

Summary

Phosphoinositides are important signalling molecules involved in the regulation of many different cellular processes. They are controlled by the interactions of specific lipid kinases and phosphatases which in turn need to be highly regulated. The Sac1p lipid phosphatase in yeast can hydrolyze PtdIns(4)P signals at the ER and Golgi membranes. Its catalytic activity is spatially regulated by shuttling between these two compartments. Additionally, *SAC1* is also regulated at a transcriptional level. Yeast strains harboring a *sac1* mutant with reduced phosphatase activity showed elevated cellular levels of Sac1p compared to wildtype strains. This work uses genetic and functional analyses to study the transcriptional control of *SAC1*.

Truncated and mutated versions of the *SAC1* promoter allowed the identification of a region essential for transcriptional activity. Deletion of basepairs within the promoter region located at -100 to -92 upstream of the transcription start site resulted in loss of promoter activity. The sequence of this essential region is ACCAGAGGT. The three outer basepairs on each side represent a palindromic structure. With gel shift assays, a protein was found to interact specifically with this region of DNA. This interaction could be significantly weakened by mutating the three base pairs on either side. By coupling oligonucleotides harboring this DNA region to CNBr-activated Sepharose, proteins that bind specifically to this region could be enriched for and analyzed by mass spectrometry. However, the binding factor could not be identified.

The *SAC1* promoter was also found to be inositol sensitive. Upon inositol starvation, its activity was elevated, while an excess of inositol resulted in reduced activity. Together with the known inositol auxotrophy phenotype of *sac1* Δ mutants, this led to the hypothesis that expression regulation of *SAC1* is coupled to lipid biosynthesis. However, analyses of the expression regulation of genes involved in inositol biosynthesis in combination with *SAC1* expression studies revealed that inositol is not the signal directly regulating the promoter activity.

We have shown that the activity of the *SAC1* promoter is correlated with intracellular levels of PtdIns(4)P. In *sac1* Δ mutants, which show 10-fold elevated levels of PtdIns(4)P, the promoter activity is also elevated. Combination of a *sac1* Δ mutation with temperature-sensitive versions of lipid kinases resulted in reduced promoter activity alongside the observed reduction of intracellular PtdIns(4)P in these strains. This led to the conclusion that PtdIns(4)P signals might be involved in regulation of *SAC1* expression. A lipid binding protein might be necessary to translate the PtdIns(4)P signal into the nucleus. Using biotinylated liposomes containing PtdIns(4)P we developed a method useful for identification of novel PtdIns(4)P-binding proteins. We demonstrated that this method was suitable to study lipid-binding characteristics of known lipid-binding proteins, and allows purification of protein quantities detectable by coomassie staining. To identify less abundant PtdIns(4)P-binding proteins further scaling-up might be necessary.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Phosphoinositide – wichtige zelluläre Signalüberträger	1
1.1.1 Phosphoinositidbindedomänen	2
1.1.2 Kinasen und Phosphatasen	3
1.1.2.1 Phosphoinositidkinasen	3
1.1.2.2 Phosphoinositidphosphatasen	5
1.1.2.2.1 Lipidphosphatasen mit Sac1-Domäne	7
1.1.3.2.2 Die Sac1 Phosphoinositidphosphatase	8
1.2 Lipidsignale und Genregulation	11
1.2.1 Genexpression in Eukaryonten	11
1.2.2 Phosphorylierte Inositolderivate und Genexpression	14
1.2.3 Regulation der Lipidbiosynthese in <i>S. cerevisiae</i> durch Opi1p	17
1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
2 Ergebnisse	20
2.1 Charakterisierung des Promotors von <i>SAC1</i>	20
2.1.1 Herstellung und Analyse von Reporterkonstrukten	20
2.1.1.1 Analyse eines Fusionsproduktes aus <i>SAC1</i> -Promotor und <i>LacZ</i>	20
2.1.1.2 Analyse eines Fusionsproduktes aus <i>SAC1</i> -Promotor und GFP	22
2.1.2 Analyse von Promotordeletionen	24
2.1.3 Charakterisierung von Protein-DNA-Interaktionen mit „EMSA“	32
2.1.4 Affinitätsreinigung mit CNBr-aktivierter Sepharose	35
2.2 Untersuchungen zur funktionellen Regulation der <i>SAC1</i>-Expression	42
2.2.1 Auswirkungen von ER-Stress auf die <i>SAC1</i> -Promotoraktivität	42
2.2.2 Abhängigkeit der <i>SAC1</i> -Expression von zellulärem Inositol	44
2.2.3 Genetische Interaktion von <i>SAC1</i> und <i>OPI1</i>	46
2.2.3.1 Die Deletion von <i>OPI1</i> komplementiert die Inositolauxotrophie von <i>sac1</i> Δ -Stämmen	46

2.2.3.2 Die Deletion von <i>OPII</i> erhöht die <i>SACI</i> -Promotoraktivität in <i>sac1</i> Δ -Stämmen	46
2.2.3.3 Opi1p interagiert nicht direkt mit der Promotorregion von <i>SACI</i>	48
2.2.4 Die <i>SACI</i> -Expression ist von zellulärem PtdIns(4)P abhängig	50
2.3 Analyse phosphoinositidbindender Proteine mit Hilfe von Liposomen	53
3 Diskussion	59
3.1 Charakterisierung der Promotorregion von <i>SACI</i>	59
3.2 Untersuchungen zur funktionellen Regulation der <i>SACI</i>-Expression	63
3.2.1 Der <i>SACI</i> -Promotor ist UPR-unabhängig aber inositolsensitiv	63
3.3.2 Genetische Interaktion zwischen <i>SACI</i> und <i>OPII</i>	64
3.3.3 PtdIns(4)P ist an der Regulation von <i>SACI</i> beteiligt	66
3.3 Affinitätsreinigung phosphoinositidbindender Proteine mit Hilfe einer Liposomenmatrix	67
4 Material und Methoden	69
4.1 Material	69
4.1.1 Geräte	69
4.1.2 Chemikalien	70
4.1.3 Enzyme	71
4.1.4 Oligonukleotide	71
4.1.5 Antikörper	72
4.1.6 Lösungen und Reagenzien	72
4.1.7 Flüssigmedien und Platten	73
4.1.7.1 Flüssigmedien	73
4.1.7.2 Platten	74
4.1.8 Hefestämme	74
4.1.8.1 Vorhandene Hefestämme	74
4.1.8.2 Konstruierte Hefestämme	74
4.1.9 Plasmide	75
4.1.9.1 Vorhandene Plasmide	75

4.1.9.2 Konstruierte Plasmide	75
4.1.10 Primer	78
4.2 Methoden	80
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	80
4.2.1.1 Polymerasekettenreaktion	80
4.2.1.2 Aufreinigung des PCR-Produkts	80
4.2.1.3 Restriktionsverdau	80
4.2.1.4 Dephosphorylierung von DNA	81
4.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	81
4.2.1.6 Ligation von DNA	81
4.2.1.7 Transformationsprotokolle	81
4.2.1.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	81
4.2.1.7.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	81
4.2.1.7.1.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	82
4.2.1.7.2 Transformation von Hefezellen	82
4.2.1.7.2.1 Niedrigeffiziente Transformation von Hefezellen	82
4.2.1.7.2.2 Hocheffiziente Transformation von Hefezellen	82
4.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	84
4.2.1.8.1 Mini-Präparation	84
4.2.1.8.2 Maxi-Präparation	84
4.2.1.9 Agarose-Gele	84
4.2.1.10 Phenolextraktion	84
4.2.1.11 Ethanolpräzipitation	85
4.2.1.12 Glycerinstocks zur Aufbewahrung von Hefestämmen	85
4.2.1.13 Präparation von genomischer DNA aus Hefe	85
4.2.1.14 Gen-„Knock-Out“ nach der Ein-Schritt-Methode	86
4.2.2 Biochemische Methoden	86
4.2.2.1 Präparationen von zellulären Fraktionen	86
4.2.2.1.1 Hefezellaufschluss	86
4.2.2.1.2 Präparation von löslichen zellulären Proteinfractionen aus Hefe	87
4.2.2.1.3 Mikrosomenpräparation	88

4.2.2.3 TCA-Fällung	89
4.2.2.4 Proteintrennung und Detektion	90
4.2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	90
4.2.2.4.2 Westernblot	90
4.2.2.4.3 Blaufärbung mit Colloidal Comassie Blue	91
4.2.2.4.4 Silberfärbung	92
4.2.2.4.5 Färbung mit Sypro-Orange	92
4.2.2.5 Phosphoinositidanalyse	93
4.2.2.6 „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA)	94
4.2.2.7 Aufreinigung lipidbindender Protein mit Liposomen	96
4.2.2.7.1 Herstellung von biotinylierten Liposomen	96
4.2.2.7.2 Präparation peripherer Membranproteine	96
4.2.2.7.3 Affinitätsreinigung mit biotinylierten Liposomen	97
4.2.2.8 Trypsinverdau von Proteinen für massenspektrometrische Analyse	97
4.2.2.9 Affinitätsreinigung DNA-bindender Proteine mit CNBr- aktivierter Sepharose	98
4.2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie	101
5 Literaturverzeichnis	102
6 Abkürzungen	118

1 Einleitung

1.1 Phosphoinositide – wichtige zelluläre Signalüberträger

Eine eukaryotische Zelle enthält mehrere intrazelluläre Kompartimente. Dadurch können zelluläre Prozesse sowohl zeitlich als auch räumlich getrennt reguliert werden. Die Abgrenzung der Kompartimente vom umgebenden Zytosol erfolgt dabei durch eine umgebende Lipiddoppelschicht. Diese Membranen sorgen aufgrund ihrer sehr selektiven Permeabilität für eine Aufrechterhaltung verschiedener Umgebungen. Für den Stoffaustausch zwischen verschiedenen Kompartimenten sorgen spezifische vesikuläre Transportsysteme. Diese Transportreaktionen unterliegen dabei einer genauen Koordination, an der eine Vielzahl von regulatorischen Elementen beteiligt ist (Bonifacino and Glick, 2004; Simonsen et al., 2001). Eines der wichtigsten regulatorischen Elemente sind dabei die Membranlipide selbst. Phosphorylierte Derivate von Phosphatidylinositol, die so genannten Phosphoinositide, nehmen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Prozessen an Membranen ein, indem sie deren Ablauf zeitlich und räumlich spezifizieren (Cockcroft and De Matteis, 2001). Phosphatidylinositol, das Vorläufermolekül der verschiedenen Phosphoinositide, wird an der zytosolischen Seite von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparates und der Mitochondrien synthetisiert (Leber et al., 1995; Nikawa and Yamashita, 1997; Whatmore et al., 1999). Phosphatidylinositol gehört zur Klasse der Phospholipide und besteht aus Diacylglycerin, das zwei langkettige Fettsäuren am C1- und C2-Kohlenstoff des Glycerinmoleküls trägt, und einem Inositolring, der an Position 1 mit dem C3-Kohlenstoff des Glycerins verbunden ist. Mit Hilfe der beiden Fettsäuren wird das gesamte Molekül in Membranen verankert. Der Inositolring kann an den Positionen 3, 4, und 5 reversibel von spezifischen Kinasen phosphoryliert werden, so dass sieben unterschiedliche Phosphatidylinositol-Phosphate entstehen (Abb. 1) (Tolias and Cantley, 1999). Alle sieben können in Membranen höherer Eukaryonten gefunden werden.

Phosphoinositide sind wichtige Signalmoleküle, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren. Dazu gehören die Organisation des Zellskeletts, die Regulation des intrazellulären Transports und andere Funktionen der Zelle (Toker, 2002). Zusätzlich

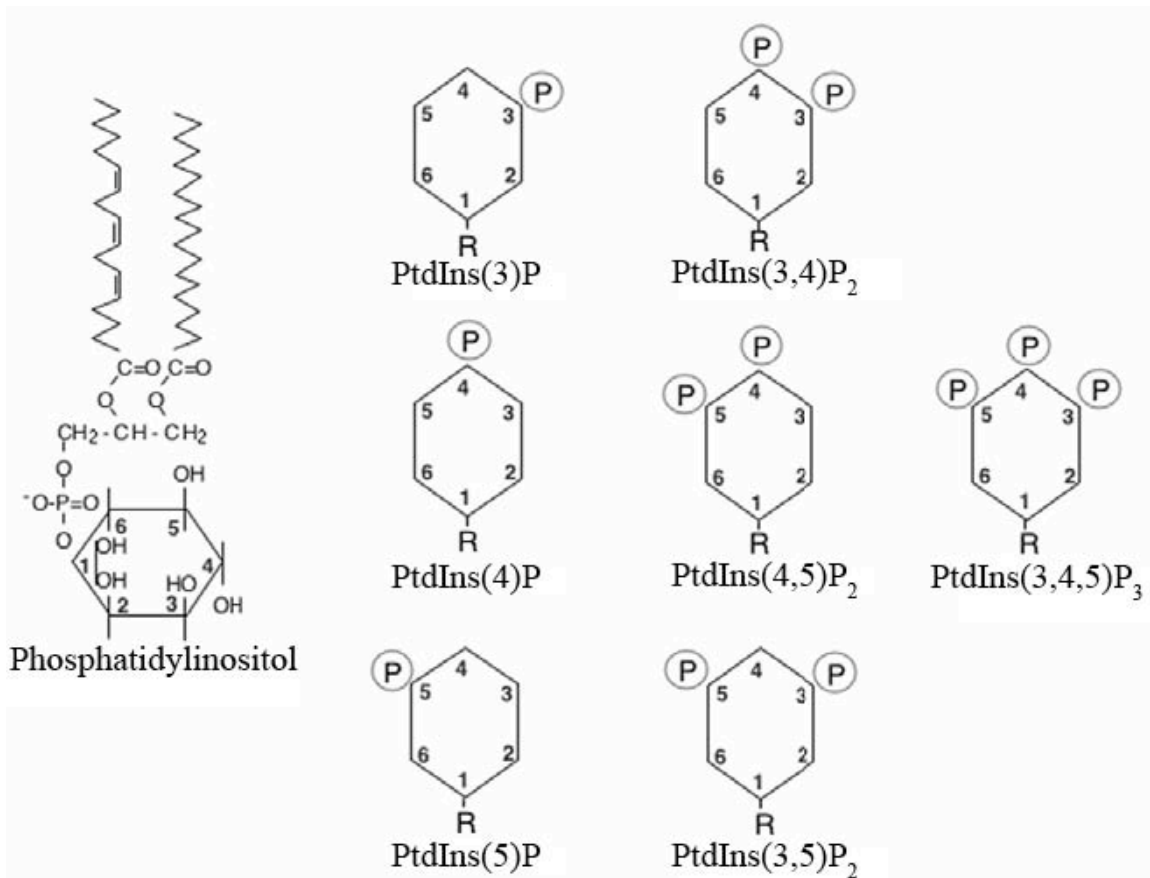


Abb. 1. Schematische Darstellung von Phosphatidylinositol und den Inositolkopfguppen der verschiedenen Phosphoinositide.

spielen Phosphoinositide auch eine Rolle bei der Regulation der Apoptose (Toker, 2002). Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Phosphoinositide nicht nur Vorläufer zur Erzeugung von sekundären Botenstoffen sind, sondern selbst als sekundäre Botenstoffe dienen (Balla, 2005; Martin, 1997; Wenk and De Camilli, 2004). Die verschiedenen Phosphoinositide machen nur ungefähr 1% aller Membranlipide aus (De Matteis and Godi, 2004). Die örtliche Produktion der verschiedenen Phosphoinositide ist an die Rekrutierung spezifischer Bindepartner gekoppelt (Hurley and Meyer, 2001). Die zellulären Mengen der Phosphoinositide werden durch Kinasen, Phosphatasen und Lipasen reguliert (Toker, 2002).

1.1.1 Phosphoinositidbindedomänen

Phosphoinositidsignale werden durch die örtliche Interaktion mit Proteinen vermittelt. Viele Proteine besitzen hierfür eine spezifische Phosphoinositidbindedomäne, die eine

gezielte Interaktion mit selektiven Phosphoinositiden ermöglicht (Lemmon, 2003). Dabei handelt es sich häufig um kooperative Bindungen verschiedener Domänen, wobei auch lipidunabhängige Komponenten eine Rolle spielen können (Lemmon, 2003).

Phosphoinositidbindedomänen wurden in zahlreichen Proteinen identifiziert. Die größte und am besten untersuchte Familie ist hierbei die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne (Yu et al., 2004). Es gibt über 200 Proteine im Menschen, die eine PH-Domäne enthalten, z.B. Proteinkinasen, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAP's), Lipidtransportproteine und Phospholipasen (Balla, 2005; Cozier et al., 2004). Zusätzlich zur PH-Domäne existiert noch eine Reihe weiterer Phosphoinositidbindedomänen wie z.B. die PX- ("phox homology"), ENTH- ("epsin N-terminal homology") und FYVE- ("Fab1, YOTB, Vac1, EEA1") Domänen. (Lemmon, 2003).

Die Spezifität der einzelnen Bindedomänen wird durch eine hohe Affinität zu den unterschiedlichen Inositolkopfgruppen der Phosphoinositide erreicht. (DiNitto et al., 2003; Hurley and Meyer, 2001). Die dreidimensionale Struktur vieler dieser Effektorproteine wurde mittels Röntgenstrukturanalysen oder kernmagnetischer Resonanz ermittelt (Lemmon, 2003).

1.1.2 Kinasen und Phosphatasen

Die Vielzahl der von Phosphoinositiden gesteuerten zellulären Prozesse unterliegt einer strengen örtlichen und zeitlichen Regulation. Um zum Beispiel auf Veränderungen in der Umgebung der Zelle wie das Vorhandensein von Nährstoffen reagieren zu können, muss eine Zelle die notwendigen Signalmoleküle schnell aktivieren, ein zuvor generiertes Signal aber auch schnell wieder terminieren können. Im Falle der Phosphoinositide kommt diese Aufgabe Enzymen aus den Klassen der Lipidkinasen, Lipidphosphatasen und Lipasen zu.

1.1.2.1 Phosphoinositidkinasen

Zu den Kinasen, die Phosphatidylinositol (PtdIns) und Phosphoinositide phosphorylieren können, zählen die Phosphoinositid-4-Kinasen, die Phosphoinositid-3-Kinasen und Phosphatidylinositolphosphatkinasen.

Den PtdIns-4-Kinasen dient PtdIns als Substrat, woraus sie PtdIns(4)P synthetisieren. Sowohl in Hefe als auch in höheren Eukaryonten gibt es zwei Familien von PtdIns-4-Kinasen, Typ II und Typ III, basierend auf Unterschieden in den biochemischen Eigenschaften der Enzyme (Balla, 1998; De Matteis et al., 2005; Gehrman and Heilmeyer, 1998; Han et al., 2002). Zu den Typ-II PtdIns-4-Kinasen der Säugetiere gehören zwei Isoformen, PtdIns4KII α und PtdIns4KII β . Mit dem *LSB6*-Gen wurde kürzlich das einzige Hefehomolog entdeckt (De Matteis et al., 2005; Han et al., 2002; Shelton et al., 2003). Lokalisationsexperimente konnten zeigen, dass PtdIns4KII α an Membranen des Golgi-Apparates und des endozytotischen Kompartiments assoziiert ist (De Matteis et al., 2005). PtdIns4KII β ist hauptsächlich zytosolisch und wird über Rac1 an die Membranen lokalisiert und aktiviert (Wei et al., 2002). Diese Typ-II-PtdIns-4-Kinasen sind wichtig für mehrere zelluläre Vorgänge wie die Sekretion und den endosomalen Vesikeltransport (Minogue et al., 2006; Wang et al., 2003). *lsb6*-Null-Mutanten in Hefe zeigen keinen erkennbaren Phänotypen, das Protein konnte sowohl an der Vakuole als auch an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Han et al., 2002; Shelton et al., 2003). In Hefe und Säugetierzellen gibt es jeweils zwei Typ-III-PtdIns-4-Kinasen. PtdIns4KIII α ist das Homolog von Stt4p in Hefe, PtdIns4KIII β ist das Homolog von Pik1p in Hefe (De Matteis et al., 2005). PtdIns4KIII α lokalisiert zum ER und zum Golgi-Apparat (Wong et al., 1997). PtdIns4KIII β ist hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert und für die strukturelle Integrität des Golgi-Apparates und den Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran wichtig (Godi et al., 1999).

Ähnlich wie die PtdIns-4-Kinasen lassen sich auch PtdIns-3-Kinasen in Subkategorien einteilen. Die Unterteilung in die Klassen I, II und III erfolgt anhand der Domänenstruktur, ihren Unterschieden in der katalytischen Aktivität gegen verschiedene Substrate und den Arten der Regulation (Fruman et al., 1998). PtdIns-3-Kinasen der Klasse I phosphorylieren PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃. Dieses ist beteiligt an der Regulation des Wachstums der Zelle, des Intermediärmetabolismus und der Organisation des Zellskeletts (Cantley, 2002). PtdIns(3,4,5)P₃ rekrutiert Signalmoleküle an die Membran, wo diese aktiviert werden (Cantley, 2002). Klasse-I-PtdIns-3-Kinasen können außerdem die kleine GTPase Ras binden (Cantley, 2002). Die PtdIns-3-Kinasen der Klasse II sind Proteine, die *in vitro* die Phosphorylierung von PtdIns und PtdIns(4)P, aber nicht von

PtdIns(4,5)P₂ katalysieren (Fruman et al., 1998). Sie können mittels einer C2-Domäne kalziumabhängig mit Phospholipidsubstraten interagieren (Rizo and Sudhof, 1998). Die Klasse-III-PtdIns-3-Kinasen können nur PtdIns zu PtdIns(3)P phosphorylieren. Die einzige PtdIns-3-Kinase in Hefe, Vps34p, gehört zu der Klasse III. Vps34p existiert im Komplex mit der Serin/Threonin Kinase Vps15p (Stack et al., 1995; Stack et al., 1993), die Vps34p in Hefe an die entsprechenden Membranen rekrutiert. Neuere Studien legen nahe, dass Vps34p an intraluminalen Vesikeln von Endosomen und Vakuolen lokalisiert ist (Gillooly et al., 2000).

Phosphatidylinositolphosphatkinasen sind für die weitere Phosphorylierung der verschiedenen Phosphoinositolphosphate notwendig. Sie lassen sich in zwei Subfamilien einteilen, die PtdInsP-4-Kinasen und PtdInsP-5-Kinasen (Fruman et al., 1998). PtdInsP-4-Kinasen können PtdIns(5)P und mit geringerer Effizienz auch PtdIns(3)P phosphorylieren, wodurch PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4)P₂ entstehen (Roth, 2004). PtdInsP-5-Kinasen verwenden PtdIns(4)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3)P als Substrate. Die Hefeproteine Fab1p und Mss4p zeigen Sequenzhomologien innerhalb der Kinasedomäne mit den identifizierten PtdInsP-5-Kinasen in Säugetieren. Fab1p ist ein PtdIns(3)P-Effektorprotein und kann PtdIns(3)P zu PtdIns(3,5)P₂ phosphorylieren (Cooke et al., 1998; Gary et al., 1998). Es ist an der Regulation der Vakuolenfunktion, der mitotischen Spindel und der chromosomalen Segregation beteiligt (Yamamoto et al., 1995). Die Fab1p-Lipidkinase lokalisiert sowohl an endosomalen als auch an vakuolaren Membranen. (Bonangelino et al., 1997; Bonangelino et al., 2002; Dove et al., 2002; Gary et al., 1998). Mss4p konnte an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Homma et al., 1998) und wurde bisher als einziges PtdIns(4,5)P₂-synthetisierendes Enzym in Hefe identifiziert. Mss4p trägt ein Lokalisierungssignal für den Zellkern, jedoch sorgt ein regulierter Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma für die Aufrechterhaltung der Funktion an der Plasmamembran. Es ist essentiell für das Wachstum von Hefe (Audhya and Emr, 2003).

1.1.2.2 Phosphoinositidphosphatasen

Die Phosphoinositidphosphatasen sind für die Terminierung der von den Kinasen erzeugten Phosphoinositidsignale an der Membran essentiell. Defekte spezifischer

Phosphoinositidphosphatasen führen zu schwerwiegenden Erkrankungen beim Menschen (Pendaries et al., 2003).

Zur Klasse der 3-Phosphoinositidphosphatasen gehört das Säugetierprotein PTEN. Es wurde ursprünglich durch die Untersuchung eines Lokus entdeckt, der bei verschiedenen menschlichen Krebsarten mutiert ist (Li et al., 1997; Maehama and Dixon, 1999; Steck et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass PTEN an der Plasmamembran lokalisiert ist. Diese Lokalisation wird über mehrfache Phosphorylierungen am C-Terminus kontrolliert (Das et al., 2003). Zu den Substraten von PTEN gehören sowohl Phosphatidylinositolphosphate, als auch lösliche Inositolphosphate (Maehama and Dixon, 1999), aber $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und möglicherweise $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ scheinen die hauptsächlichen Substrate zu sein (Leslie et al., 2001). PTEN ist somit in der Lage, die Signale der Klasse-I-PtdIns-3-Kinasen wieder abzuschalten (Leslie et al., 2001). In Hefe wurde kürzlich das PTEN-Homolog *Tep1p* identifiziert, dessen Funktion mit dem Phosphatidylinositol-Signalweg verknüpft ist und das eine Rolle bei der Sporulation spielt (Heymont et al., 2000). Eine weitere Gruppe von 3-Phosphoinositidphosphatasen sind die Myotubularine (MTMs) mit einer Spezifität für $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ und $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ (Clague and Lorenzo, 2005). Mutationen in MTM-Proteinen resultieren in Krankheiten, wie z.B. der myotubularen Myopathie und dem Charcot–Marie–Tooth-Syndrom. MTMs scheinen eine Rolle bei der Regulation des endozytotischen Weges zu spielen (Clague and Lorenzo, 2005).

Die große Familie der 5-Phosphatasen wird in die Klassen I und II unterteilt. Nur Typ-II-5-Phosphatasen können Phosphoinositide hydrolysieren (Hughes et al., 2000a). Enzyme beider Klassen tragen eine konservierte katalytische Domäne; die Typ-II-5-Phosphatasen haben zusätzlich noch eine weitere Region, die Typ-II-Domäne genannt wird (Hughes et al., 2000a). Zusätzlich zu dieser Domäne tragen die Typ-II-5-Phosphatasen noch weitere regulatorische Domänen, die jeweils für eine spezifische Gruppe von Enzymen wichtig sind. Ein Beispiel hierfür ist die Src-homologe (SH2)-Domäne, die man in SHIP-Phosphatasen vorfindet (SH2-Domäne enthaltende Inositid-5-Phosphatasen) (Hughes et al., 2000a).

1.1.2.2.1 Lipidphosphatasen mit Sac1-Domäne

Zur Klasse der Typ-II-5-Phosphatasen gehört eine Gruppe von Enzymen, die eine Sac1-Domäne am N-Terminus tragen und deshalb auch SCIPs genannt werden (Sac1-Domäne-enthaltende Inositid-5-Phosphatasen) (Hughes et al., 2000a). Die Sac1-Domäne wurde zuerst im Hefeprotein Sac1p identifiziert (Guo et al., 1999). Sie zeigt Phosphataseaktivität gegenüber Phosphatidylinositolpolyphosphaten und umfasst etwa 400 Aminosäuren. Die hydrolysierende Aktivität wird durch ein CX₅R(T/S)-Motiv charakterisiert, das auch in vielen metallunabhängigen Protein- und Lipidphosphatasen vorgefunden wird (Whisstock et al., 2002). Die Sac1-Domäne kann Phosphate an der 3, 4 oder 5 Position der Inositolkopfgruppe entfernen (Hughes et al., 2000a). Phosphatasen mit Sac1-Homologie-Domäne sind die bisher einzigen identifizierten Lipidphosphatasen, die PtdIns(4)P spalten können (Hughes et al., 2000a). Synaptojanin 1 ist ein Vertreter dieser Phosphataseklasse in Säugetierzellen. Dessen 5-Phosphatasedomäne kann das Phosphat an Position 5 der Inositolkopfgruppe entfernen, u.a. bei PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃. Die Sac1-Domäne kann zusätzliche Dephosphorylierungsreaktionen katalysieren (Guo et al., 1999; McPherson et al., 1996; Woscholski et al., 1997). Synaptojanin 1 wurde in Nervenenden nachgewiesen, wo es die PtdIns(4,5)P₂-Menge und die clathrinvermittelte Endozytose von synaptischen Vesikeln reguliert (Cremona and De Camilli, 2001). Zusätzlich zu der Sac1-Domäne und 5-Phosphatase-Domäne enthält Synaptojanin 1 eine C-terminale prolinreiche Domäne, die für die Lokalisation an die entsprechende Membran notwendig ist. Es kann mit einer großen Anzahl an Proteinen, wie z.B. Endophilin und DAP160/Intersectin interagieren (Ringstad et al., 1997; Roos and Kelly, 1998; Slepnev et al., 2000).

Homologe der 5-Phosphatasen, die sowohl eine 5-Phosphatase- als auch eine Sac1-Domäne (SCIP Klasse) enthalten, wurden auch in Hefezellen nachgewiesen (Stolz et al., 1998). Diese Proteine werden als funktionale Homologe des Säugersynaptojanins betrachtet und heißen daher Sjl1p, Sjl2p und Sjl3p (oder Inp51p, Inp52p und Inp53p). Die Sac1-Domäne von Sjl1p ist inaktiv (Guo et al., 1999). Sjl2p reguliert den Aufbau des Aktinzellskeletts, die Endozytose und den clathrinabhängigen Transport zwischen Golgi-Apparat und Endosomen. (Stefan et al., 2002). Sjl3p scheint am Transport von Clathrinvesikeln vom Golgi-Apparat zur Vakuole beteiligt zu sein (Bensen et al., 2000;

Ha et al., 2001). Das Ausschalten von allen drei Phosphatasen der Sjl-Genfamilie ist für die Zelle letal (Stefan et al., 2002). Einzel- oder Doppeldeletionen von *SJL1*, *SJL2* und *SJL3* führen zu zellulären Defekten, was auf eine funktionelle Redundanz dieser Enzyme hinweist.

In Hefe wurden zwei Proteine identifiziert, die eine Sac1-Domäne, aber keine 5-Phosphatase-Domäne haben. Diese Proteine heißen Sac1p und Fig4p. Es wurde gezeigt, dass Fig4p *in vitro* PtdIns(3,5)P₂ dephosphorylieren kann (Rudge et al., 2004) und somit die Signale der PtdIns(3)P-5-Kinase Fab1p terminiert. Fig4p besitzt im Gegensatz zu Sac1p keine Transmembrandomänen und benötigt ein anderes Protein für die Lokalisation zur Vakuolenmembran (Duex et al., 2006; Rudge et al., 2004). In der *fig4*-Nullmutante treten Mating- und Aktinlokalisierungsdefekte auf (Erdman et al., 1998).

1.1.2.2 Die Sac1 Phosphoinositidphosphatase

Die Phosphoinositidphosphatase Sac1p wurde ursprünglich als Suppressor einer temperatursensitiven Aktinmutation (*act1-1^{ts}*) in Hefe entdeckt (Cleves et al., 1989; Novick et al., 1989). Sac1 wird in allen Eukaryoten von Hefe bis zu den Säugetieren vorgefunden. Das Sac1-Homolog in *Drosophila melanogaster* ist an der Regulation der dorsalen Schließung beteiligt, einem Schlüsselereignis in der Entwicklung des Embryos (Wei et al., 2003). In der Pflanze *Arabidopsis thaliana* gibt es neun Proteine, die eine Sac1-Domäne enthalten, deren Funktion weitgehend unbekannt ist. AtSAC1 ist das Sac1p Homolog in *Arabidopsis thaliana*. Es wurde gezeigt, dass AtSAC1 für die normale Zellmorphogenese, die Zellwandsynthese und die Organisation des Aktinzellskeletts wichtig ist (Zhong et al., 2005).

Das Säugetierhomolog von Sac1p wurde zuerst in der Ratte identifiziert (Nemoto et al., 2000) und kann Sac1p in Hefe funktionell ersetzen. Humanes SAC1 lokalisiert zu ER und Golgi und interagiert mit dem Coatomer I Komplex (Rohde et al., 2003). Die genauen zellulären Funktionen der Säugetier-SAC1-Phosphatase sind bis jetzt noch nicht aufgeklärt.

Sac1p in Hefe (Abb. 2) ist ein 70 kDa großes Typ-II-Transmembranprotein mit C- und N-Terminus im Zytosol, das im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Konrad et al., 2002; Whitters et al., 1993). Sac1p kann PtdIns(3)P, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4)P *in vitro*

dephosphorylieren, wobei die Effizienz und Aktivität gegenüber den Monophosphaten am größten ist. PtdIns(4,5)P₂ wird von Sac1p nicht dephosphoryliert. In der Nullmutante von *SAC1* ist die Menge an PtdIns(4)P ca. acht- bis zehnfach, die PtdIns(3)P-Menge 1,5-fach und die PtdIns(3,5)P₂-Menge geringfügig erhöht, während die PtdIns(4,5)P₂-Menge leicht verringert ist (Foti et al., 2001; Guo et al., 1999; Hughes et al., 2000b; Konrad et al., 2002). Die Hauptaufgabe von Sac1p scheint also in der Regulation von PtdIns(4)P zu liegen.

Sac1p trägt keines der charakterisierten ER-Retentionssignale (Konrad et al., 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Sac1p mit dem am ER lokalisierten Enzym Dpm1p interagiert und durch diese Interaktion im ER lokalisiert wird (Faulhammer et al., 2005). Dpm1p synthetisiert Dolicholphosphatmannose, einen wichtigen Mannosyldonor für Glykosylierungsreaktionen im ER. (Herscovics and Orlean, 1993; Orlean, 1990). Wird das aktive Zellwachstum durch Entzug der Nährstoffe blockiert, so löst sich die Interaktion zwischen Sac1p und Dpm1p und Sac1p wird in den Golgi-Apparat transloziert (Faulhammer et al., 2005). Dieser reversible Wechsel in der Lokalisation geht mit der reziproken Kontrolle der Level an PtdIns(4)P in diesen beiden Organellen einher. Befindet sich Sac1p im Golgi-Apparat, so wird dort die PtdIns(4)P-Menge gesenkt, was

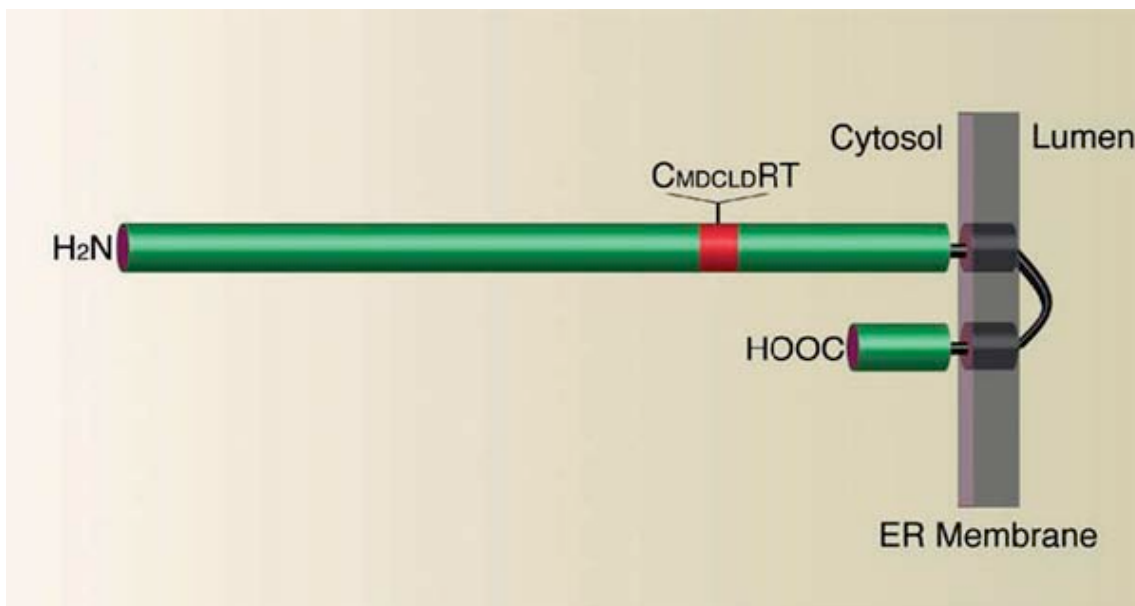


Abb. 2. Schematische Darstellung der Lipidphosphatase Sac1p. Sac1p ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen zytosolischen Domäne, die auch das katalytische Phosphatasemotiv CX5N(T/S) enthält.

den anterograden Transport aus dem Golgi dramatisch verlangsamt (Faulhammer et al., 2005). Gleichzeitig führt die Abwesenheit von Sac1p von ER-Membranen zu einer Erhöhung der PtdIns(4)P-Werte, was zu einer Reduktion der Proteinprozessierung im ER zur Folge hat (Kochendorfer et al., 1999).

Sac1p hat kompartimentspezifische Funktionen im ER und im Golgi (Konrad et al., 2002). Im Golgi-Apparat ist Sac1p an der Regulation der Sekretion beteiligt. Es spaltet PtdIns(4)P, und agiert somit als Antagonist der PtdIns-4-Kinase Pik1p (Schorr et al., 2001). PtdIns(4)P im Golgi-Apparat ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Sekretion von Proteinen aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran (De Matteis et al., 2005). Ist Sac1p abwesend von Golgimembranen, führt dies zu einem erhöhten Transport von Chitinsynthasen aus dem Golgi-Apparat, was spezifische Zellwanddefekte zur Folge hat (Konrad et al., 2002; Schorr et al., 2001). Die Deletion von *SAC1* kann wie eine Pik1p-Überexpression eine Deletion von *SEC14* komplementieren. (Cleves et al., 1989; Hama et al., 1999; Hughes et al., 1999). Sec14p ist ein Phosphatidylinositol/Phosphatidylcholin Transferprotein, das für die Generierung sekretorischer Vesikel vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran benötigt wird. Dies bestätigt die wichtige Rolle, die PtdIns(4)P in der Sekretion am Golgi-Apparat spielt. Neueste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sac1p zudem wichtig für die Regulation des Stt4p-spezifischen PtdIns(4)P-Pools in der Zelle ist und somit auch an der Regulation der Endozytose und des vakuolaren Transports beteiligt ist (Foti et al., 2001; Tahirovic et al., 2005). Die *sac1*-Nullmutante ist außerdem kältesensitiv, da sie unterhalb von 15°C ein eingeschränktes Wachstum zeigt (Cleves et al., 1989; Novick et al., 1989), ferner inositolauxotroph (Whitters et al., 1993) und hat Defekte in der Vakuolenmorphologie (Foti et al., 2001).

An ER-Membranen ist Sac1p wichtig für eine effiziente Oligosaccharidbiosynthese (Faulhammer et al., 2005). Befinden sich Zellen in der späten logarithmischen Wachstumsphase, so wird die Oligosaccharidbiosynthese unabhängig von Sac1p herunterreguliert. In schnell wachsenden Zellen jedoch ist eine effiziente Oligosaccharidbiosynthese abhängig von ER-residentem Sac1p. In *sac1*-Nullmutanten akkumuliert unter diesen Bedingungen die für die N-Glykosylierung wichtige Vorstufe Man₅GlcNAc₂-PP-Dol (M5N2). Des Weiteren ist Sac1p an der Regulation der ATP-Aufnahme in das ER-Lumen beteiligt. In *sac1*-Nullmutanten ist die ATP-Aufnahme in das ER stark reduziert.

(Kochendorfer et al., 1999). Der Mangel an ATP führt zur Aktivierung der UPR („unfolded protein response“), da die Proteinfaltungsreaktionen der Chaperone im ER-Lumen ATP-abhängig sind. Mutanten, die Sac1p ausschließlich im ER lokalisieren, zeigen einen erhöhten ATP-Transport in das ER-Lumen (Konrad et al., 2002). Zusätzlich ist der Transport vom ER zum Golgi-Apparat verlangsamt (Kochendorfer et al., 1999; Mayinger et al., 1995).

1.2 Lipidsignale und Genregulation

Sac1p ist Teil einer komplexen Maschinerie, die über Erzeugung und Abschaltung von spezifischen Lipidsignalen wichtige Funktionen in der Zelle steuert. Die Vielfalt dieser Funktionen erfordert, dass die daran beteiligten Enzyme einer sehr genauen Regulation unterworfen sind. Allerdings ist bisher wenig darüber bekannt, wie die Steuerung dieser Proteine erfolgt. Ein wesentlicher Kontrollmechanismus könnte eine Regulation dieser Proteine auf Ebene der Transkription sein. In den letzten Jahren konnten Daten gewonnen werden, die eine Beteiligung der Substrate von Lipidkinasen und -phosphatasen an der Steuerung der Genexpression postulierten. Im folgenden Abschnitt soll zunächst die allgemeine Regulation der Genexpression und anschließend detailliertere Regulationsmechanismen diskutiert werden.

1.2.1 Genexpression in Eukaryonten

Viele Gene werden nur dann transkribiert, wenn die Zelle eine bestimmte Differenzierung erreicht, sie in eine bestimmte Phase des Zellzyklus eintritt, oder als Antwort auf äußere Signale oder Umweltreize. Diese differentielle Aktivität der Gene unterliegt einer sehr genauen Regulation. Hierfür hat die Zelle verschiedene Methoden entwickelt. Zum einen kommt der Chromatinstruktur der DNA eine wesentliche Bedeutung bei der Transkriptionskontrolle zu. Transkriptionell aktive Bereiche liegen dabei als Euchromatin vor. Der weitaus größere Teil des Genoms ist als Heterochromatin angeordnet, das aufgrund der dichten räumlichen Packung eine große Zahl an Protein-DNA Interaktionen wie die Transkription von Genen verhindert. Mittels chromatinmodifizierender Enzyme kann die Zelle den Zugang zu bestimmten Chromatinbereichen für die transkriptionelle Maschinerie ermöglichen oder auch blockieren (Cheung et al., 2000). Diese Faktoren

lassen sich in zwei Klassen unterteilen, zum einen die histonmodifizierenden Enzyme und zum anderen die ATP-abhängigen chromatinverändernden Komplexe (Belotserkovskaya and Berger, 1999; Kingston and Narlikar, 1999; Kornberg and Lorch, 1999; Maldonado et al., 1999; Strahl and Allis, 2000; Struhl, 1999; Wade and Wolffe, 1999).

Neben der Chromatinmodifikation kann die Regulation der Genexpression auch auf Ebene der Translation erfolgen. So können „P-Bodies“ die Rate der Translation an den Ribosomen verlangsamen, indem sie die mRNA-Moleküle degradieren (Sweet et al., 2007). Zusätzlich kann die posttranslationale Modifikation der mRNA im Nukleus und somit auch deren Export in das Zytoplasma verlangsamt werden.

Weitaus effektiver jedoch erfolgt die Kontrolle der Genexpression schon vor der Transkription. Diesen Zweck erfüllen so genannte Transkriptionsfaktoren, regulatorische Proteine, die durch Bindung an spezifische DNA-Elemente direkten Einfluss auf die Transkription nehmen können. Zu den DNA-Bereichen, die die Transkription von Genen regulieren, gehören der basale Promotor (Core-Promotor), der proximale und distale Promotor sowie weiter entfernt gelegene Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Der basale Promotor ist der minimale für eine Transkription notwendige DNA-Abschnitt. Er beinhaltet die TATA-Box und ist in der Regel innerhalb der ersten vierzig Basenpaare stromaufwärts der Startregion lokalisiert (Blackwood and Kadonaga, 1998; Maniatis et al., 1987). An die TATA-Box bindet unter anderem der Transkriptionsfaktor IID, ein Komplex aus mehreren Proteinen (Dymlacht et al., 1991; Weinzierl et al., 1993), der zusammen mit der RNA-Polymerase II und einigen anderen basalen Transkriptionsfaktoren den Präinitiationskomplex ausbildet (Hori and Carey, 1994; Saltzman and Weinmann, 1989). Die stromaufwärts gelegenen proximalen und distalen Promotorbereiche können weitere regulatorische Elemente enthalten. Die Aktivität des basalen Promotors kann durch weitere Bindungssequenzen in unmittelbarer Nähe wie die CCAAT-Box (McKnight and Tjian, 1986) und die SP1-Box (Dyran and Tjian, 1985) erhöht werden. Diese regulatorischen Elemente werden als “upstream promotor elements” (UPEs) bezeichnet. Zusätzlich zu diesem Bereich können regulatorische Bindungsstellen existieren, die hunderte von Basenpaaren vom Transkriptionsstartpunkt entfernt sind. Führt die Bindung eines Transkriptionsfaktors an eine solche Stelle zu einer

Verstärkung der Transkription, so spricht man von einem “Aktivator” oder “Enhancer” (Dyran, 1989; Voss and Pongs, 1986). Bindungsstellen mit negativem Effekt werden “Silencer” genannt (Brand et al., 1985; Shore and Nasmyth, 1987).

Transkriptionsfaktoren lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die basalen und regulatorischen Transkriptionsfaktoren. Die basalen Transkriptionsfaktoren bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den Präinitiationskomplex an der TATA-Box aus. *In vitro* ist dieser für eine Stimulation der Transkription ausreichend (Lewin, 1990; Roeder, 1991). Für eine Stimulation *in vivo* hingegen sind zusätzlich regulatorische Transkriptionsfaktoren notwendig (Wingender, 1988). Dies sind signal- und gewebsspezifische Proteine, welche die Transkription durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen einleiten können. Viele Transkriptionsfaktoren sind durch einen modularen Aufbau unterschiedlicher Funktionsdomänen charakterisiert, die sowohl für die Transkriptionsinitiation (Transaktivierungsdomäne) als auch für die DNA-Bindung (DNA-Bindedomäne) wichtig sind. Mit Hilfe der Transaktivierungsdomäne können Transkriptionsfaktoren mit dem Präinitiationskomplex am Core-Promotor interagieren. Es wird vermutet, dass durch diese Interaktion der Präinitiationskomplex an den Core-Promotor rekrutiert wird oder eine Konformationsänderung ausgelöst wird, die die Initiation der Transkription einleitet (Kornberg, 1996; Roeder, 1996). Oft wird die Wirkung der Transkriptionsfaktoren über so genannte Kofaktoren erreicht, die selber nicht an die DNA binden können, jedoch zwischen Transkriptionsfaktoren und Promotor vermitteln (Berger et al., 1990; Lin et al., 1991; Pugh and Tjian, 1990). Zusätzlich wurde gezeigt, dass viele Transkriptionsfaktoren durch Modifikationen wie Phosphorylierung, Glycosylierung oder Acetylierung reguliert werden können (Jackson et al., 1990; Sorger et al., 1987).

Die DNA-Bindedomänen weisen trotz unterschiedlicher Sequenzen strukturelle Ähnlichkeiten auf, da sie sich dem Aufbau der DNA-Doppelhelix anpassen, aber auch ihre spezifische Bindungssequenz erkennen müssen. So kann ein Teil der DNA-bindenden Proteine gemäß der Struktur ihrer DNA-Bindedomäne in Familien unterteilt werden (Krajewska, 1992; Pabo and Sauer, 1992; Schleif, 1988).

Eines der ersten bekannten DNA-Bindungsmotive war das Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH). Es besteht aus zwei α -Helices, die über einen kurzen Aminosäurenstrang

miteinander verbunden sind. Die am C-Terminus befindliche Helix vermittelt dabei die Bindung an die große Furche des DNA-Doppelstrangs. (Brennan and Matthews, 1989). Ein weiteres Helix-Motiv ist die basische Helix-Loop-Helix-Domäne. (bHLH). Transkriptionsfaktoren mit diesem DNA-Bindungsmotiv kommen als Dimere vor. Die Bindedomäne besteht aus zwei α -Helices die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Die größere der beiden Helices trägt eine Reihe basischer Aminosäuren welche die Bindung an die DNA ermöglichen (Davis et al., 1990; Krajewska, 1992; Murre et al., 1989). Ebenfalls ausschließlich als Dimere kommen Transkriptionsfaktoren mit dem basischen Leucin-Zipper (bZip)-Motiv vor (Vinson et al., 1989). Die Dimerisierung zweier Transkriptionsfaktoren wird hierbei durch einen α -helikalen Bereich vermittelt, der alle sieben Aminosäuren ein Leucin aufweist. Die Bindung an die DNA erfolgt über einen etwa 30 Aminosäuren umfassenden basischen Abschnitt (Johnson and McKnight, 1989). Schließlich wurde noch die so genannte Zinkfingerdomäne als DNA-Bindedomäne charakterisiert. Diese besteht aus zwei antiparallelen β -Strängen am N-Terminus und einer C-terminalen α -Helix, die sich um ein zentrales Zink-Ion faltet, das für die Stabilität der Domäne essentiell ist. Die Bindung an die DNA ist dabei von dem Zusammenspiel mehrerer benachbarter Zink-Finger abhängig, so dass immer mehrere Zinkfingerdomänen innerhalb eines Transkriptionsfaktors vorkommen (Evans and Hollenberg, 1988; Parraga et al., 1988).

1.2.2 Phosphorylierte Inositolderivate und Genexpression

Neben den klassischen Proteintranskriptionsfaktoren, die durch Bindung an *cis*-Elemente des Promotors direkt die Transkription beeinflussen können, sind in den letzten Jahren viele Daten publiziert worden, die bestimmten Phospholipiden und phospholipidstämmigen Molekülen eine Beteiligung an der Transkriptionskontrolle nachweisen konnten (Bunce et al., 2006; York, 2006). Es konnten viele Hinweise gefunden werden, dass wie an zytosolischen Membranen auch im Nukleus ein aktiver Phosphoinositidzyklus existiert. Unter anderem konnten sowohl PtdIns(4,5)P₂ als auch PtdIns(4,5)P₂-erzeugende Kinasen im Nukleus nachgewiesen werden (Boronenkov et al., 1998; Ciruela et al., 2000; Payrastre et al., 1992). PtdIns(4,5)P₂ scheint dabei jedoch nicht an Membranen, sondern in so genannten „nuclear speckles“ lokalisiert zu sein (Osborne et

al., 2001), intranukleare Partikel, die wichtig für die posttranslationale mRNA-Prozessierung sind (Huang and Spector, 1996; Pombo and Cook, 1996). PtdIns(4,5)P₂ scheint dabei eine wichtige Rolle bei der Regulation der mRNA-Prozessierung zu spielen. Wird PtdIns(4,5)P₂ mit spezifischen Antikörpern von nuklearen HeLa-Extrakten entfernt, so wurde das Spleißen der mRNA *in vitro* unterbunden. (Osborne et al., 2001). Doch auch an der Regulation der Genexpression ist PtdIns(4,5)P₂ beteiligt. So wurde gezeigt, dass PtdIns(4,5)P₂ Proteinkomplexe reguliert, die für die Modifikation der Chromatinstruktur verantwortlich sind (Rando et al., 2002; Zhao et al., 1998). PtdIns(4,5)P₂ kann dabei direkt an den C-Terminus des Histonproteins H1 binden, einem Inhibitor der RNA-Polymerase II. Durch die Bindung an PtdIns(4,5)P₂ wird H1 von der DNA entfernt und die transkriptionelle Aktivität erhöht (Yu et al., 1998). Kürzlich konnten Hinweise für einen weiteren PtdIns(4,5)P₂-vermittelten Mechanismus zur Regulation der Chromatinstruktur gefunden werden. So wurde gezeigt, dass die Zugabe von PtdIns(4,5)P₂ zu ruhenden T-Lymphozyten die Assoziation des chromatin-modifizierenden BAF-Proteinkomplexes mit Chromatin auslöst, was eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zur Folge hat. (Zhao et al., 1998). Viele dieser chromatin-regulierenden Proteine enthalten eine charakteristische PHD-Domäne („plant homeodomain“), eine konservierte Zinkfingerdomäne (Aasland et al., 1995), die die Interaktion mit Phosphoinositiden ermöglicht. Ein Beispiel hierfür ist der potentielle Tumorsuppressor ING2, der mit seiner Zinkfingerdomäne mit PtdIns(5) interagiert (Gozani et al., 2003). Mitglieder der ING-Proteinfamilie regulieren chromatin-modifizierende Enzyme wie die Histonacetyltransferase (HAT) und Histondeacetylasekomplexe (Feng et al., 2002). Dabei ist die Aktivität von ING2 von PtdIns(5)-Mengen im Nukleus abhängig. Wird PtdIns(5) durch Überexpression einer 5-Kinase im Nukleus verbraucht, so löst sich die ING2-Chromatin-Assoziation. PtdIns(5) scheint somit ein wichtiges Signal zur Lokalisation von ING2 zu sein (Gozani et al., 2003).

Neben spezifischen Phosphoinositiden sind auch das Spaltprodukt von PtdIns(4,5)P₂, das Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃), und weiter modifizierte Derivate für die Regulation der Genexpression bedeutungsvoll. (York, 2006). In Hefe wird IP₃ durch das Wirken der Phospholipase C Plc1p erzeugt, das die Abspaltung der Inositolgruppe des PtdIns(4,5)P₂

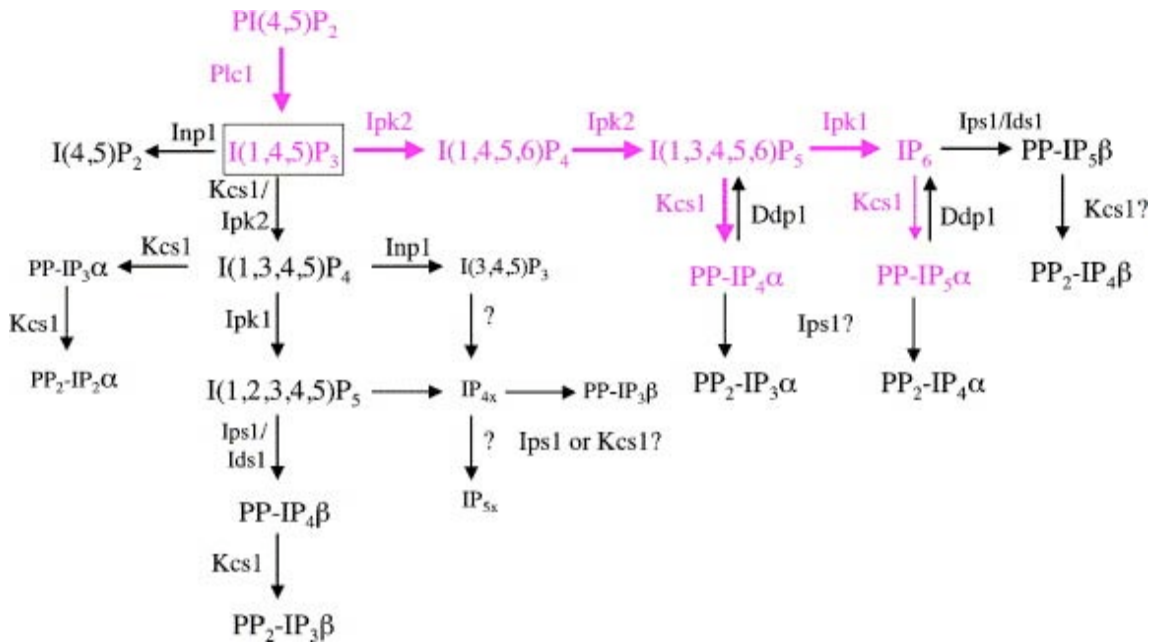


Abb. 3. Schema der Reaktionswege zur Erzeugung von Inositolpolyphosphaten in Hefe. Die ursprünglich beschriebenen Reaktionswege von Plc1, Ipk2, Ipk1 und Kcs1, die PIP₂ in IP₃, IP₄, IP₆, PP-IP₄ und PP-IP₅ umwandeln, sind in magenta hervorgehoben. Entnommen von (York, 2006).

katalysiert. IP₃ ist ein wichtiges intrazelluläres Signalmolekül (Berridge, 1993; Hokin, 1985), aber gleichzeitig auch Substrat für Modifikationen durch weitere Kinasen und Phosphatasen. IP₃ steht dabei am Anfang einer Kaskade von Modifikationsreaktionen, die zu einer Vielzahl von zellulären Botenstoffen führt (s. Abb. 3) (York, 2006). Der Aufgabenbereich dieser Inositolpolyphosphate reicht dabei über die Kontrolle des mRNA-Exports aus dem Zellkern (Feng et al., 2001; Miller et al., 2004; York et al., 1999), der RNA-Editierung (Hanakahi et al., 2000; Macbeth et al., 2005), der Regulation der Telomere (Saiardi et al., 2005; York et al., 2005), und der DNA-Reparatur (Huang and Symington, 1995; Luo et al., 2002) bis hin zur Regulation der Genexpression (Odom et al., 2000; Romero et al., 2006; Shen et al., 2003; Steger et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Inositolpolyphosphate die Aktivität verschiedener chromatinmodifizierender Proteinkomplexe regulieren können, die für eine effiziente Transkription erforderlich sind. So hemmt IP₆ die Mobilisierung von Nukleosomen über NURF, ISW2 und INO80-Komplexe und somit auch eine effektive Transkription. Im Gegensatz hierzu haben IP₄ und IP₅ stimulierenden Einfluss auf den nukleosomenmobilisierenden SWI/SNF-Komplex in Hefe (Shen et al., 2003). Mutationen in Genen, welche die IP₄-, IP₅- und IP₆-

erzeugenden Inositolpolyphosphatkinasen kodieren, zeigen allgemeine Transkriptionsdefekte (Shen et al., 2003).

1.2.3 Regulation der Lipidbiosynthese in *S. cerevisiae* durch Opi1p

Wie alle zellulären Prozesse unterliegt auch die Synthese von Phospholipiden einer strengen Regulation (Carman and Henry, 1989). In Hefe wird die Expression der Gene, die für die Produktion von Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin verantwortlich sind, durch Inositol und Cholin reguliert (Jesch et al., 2005; Santiago and Mamoun, 2003). Bei Abwesenheit von Inositol und Cholin werden diese Gene maximal exprimiert (Carman and Henry, 1999; Greenberg and Lopes, 1996; Henry and Patton-Vogt, 1998), die Zugabe von Inositol und Cholin ins Wachstumsmedium hingegen hat die unmittelbare Abschaltung dieser Gene zur Folge (White et al., 1991). Diese inositol- und cholinvermittelte Genregulation wird durch das Zusammenwirken der Transkriptionsfaktoren Ino2p, Ino4p und Opi1p erreicht (Carman and Henry, 1999; Greenberg and Lopes, 1996; Henry and Patton-Vogt, 1998). Ino2p und Ino4p sind genaktivierende Transkriptionsfaktoren des Typs Helix-Loop-Helix, wohingegen Opi1p eine hemmende Wirkung zeigt (Carman and Henry, 1999; Greenberg and Lopes, 1996; Henry and Patton-Vogt, 1998). Vermittelt wird diese Regulation durch ein *cis*-Element im Promotor der entsprechenden Gene, das so genannte UAS_{INO}-Element (Ambroziak and Henry, 1994; Nikoloff and Henry, 1994). Das UAS_{INO}-Element beinhaltet die Bindestelle für einen Ino2p-Ino4p-Dimer, der verantwortlich für die maximale Transkription der Strukturgene mit einem UAS_{INO}-Element ist. Die Repression der Gene für die Lipidbiosynthese obliegt dem Repressor Opi1p (Ashburner and Lopes, 1995; White et al., 1991). Opi1p wurde ursprünglich auf der Basis eines Phänotyps mit Überproduktion von Inositol identifiziert. (overproduction of inositol) (Greenberg et al., 1982). Die *opi1*-Nullmutante wird durch eine Überproduktion an Inositol charakterisiert. (Jiranek et al., 1998). Opi1p beinhaltet ein Leucine-Zipper Motiv und zwei glutaminreiche Domänen (White et al., 1991), die beide für die hemmende Aktivität von Opi1p erforderlich sind (Wagner et al., 1999). Wie Ino2p und Ino4p vermittelt Opi1p seine regulatorische Wirkung über das UAS_{INO}-Element, jedoch nicht durch direkte Bindung, sondern durch Interaktion mit an DNA-gebundenem Ino2p (Wagner et al., 2001). Diese Bindung wird durch eine Region am C-

terminalen Ende vermittelt, die so genannte "activator interaction domain" (AID) (Heyken et al., 2005). Ino2p beinhaltet eine vergleichbare „repressor interaction domain" (RID), die ebenso wie die AID für eine Interaktion der beiden Proteine essentiell ist. (Heyken et al., 2005; Wagner et al., 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Opi1p mittels einer OSID ("Opi1p-Sin3p interaction domain") genannten N-terminalen Region mit dem globalen Repressor Sin3p interagiert (Wagner et al., 2001). Sin3p wiederum rekrutiert die Histondeacetylase Rpd3p. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass Ino2p Opi1p zu den Zielpromotoren rekrutiert, und Opi1p wiederum den Sin3p-Rpd3p-Komplex rekrutiert (Kaadige and Lopes, 2006). Allerdings wurde gezeigt, dass die OSID-Region nicht für eine aktive Repression notwendig ist (Wagner et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass die Interaktion mit Sin3p nicht für die cholin- und inositolvermittelte Genregulation essentiell ist (Heyken et al., 2003).

Unter Bedingungen mit aktivierter Lipidbiosynthese wird Opi1p durch Interaktion mit Scs2p als Komplex mit neun anderen Proteinen im ER lokalisiert. (Gavin et al., 2002; Loewen and Levine, 2005; Loewen et al., 2003). Der Arrest im ER wird zusätzlich durch die Interaktion von Opi1p mit Phosphatidsäure, einer Vorstufe im Lipidsyntheseweg, gewährleistet. Unter reprimierenden Bedingungen (ausreichend Inositol und Cholin vorhanden) wird der Phosphatidsäurelevel in der Zelle reduziert und Opi1p aus dem ER in den Nukleus entlassen (Loewen et al., 2004). Auch posttranslationale Modifikationen spielen für die Funktionalität von Opi1p eine Rolle. So wird Opi1p sowohl von Proteinkinase A als auch Proteinkinase C phosphoryliert (Sreenivas and Carman, 2003; Sreenivas et al., 2001). Werden die entsprechenden Phosphorylierungsstellen mutiert, geht ein Teil der Reprimierungsfunktion von Opi1p verloren (Sreenivas and Carman, 2003; Sreenivas et al., 2001).

1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Phosphoinositidphosphatase Sac1p in Hefe ist an der Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, wie z. B. dem ATP-Transport in das ER-Lumen, der Organisation des Aktinzellskelettes, der Proteinglykosylierung sowie der Sekretion. Wie die genaue Regulation dieser Prozesse abläuft, ist bisher noch unklar. Jedoch erfordert die Vielzahl an zellulären Mechanismen, an denen Sac1p beteiligt ist, dass Sac1p selbst einer

sehr genauen Regulation unterworfen ist. In unserem Labor konnten Hinweise gefunden werden, dass die Expression einer Sac1p-Mutante mit reduzierter katalytischer Aktivität im Vergleich zur Wildtypversion von Sac1p deutlich erhöht war. Welche Mechanismen dieser Regulation zu Grunde liegen, ist jedoch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der Expression von *SAC1* untersucht werden. Hierfür wurden mehrere Strategien verfolgt. Zum einen sollte der Promotorbereich von *SAC1* analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten durch molekularbiologische Untersuchungen regulatorisch wichtige Bereiche identifiziert und charakterisiert werden. In einem zweiten Ansatz sollte die Regulation der *SAC1*-Expression als Reaktion auf äußere Reizbedingungen studiert werden. Es sollte herausgefunden werden, welche Prinzipien der Regulation der *SAC1*-Expression zu Grunde liegen. Die dritte Strategie war die Identifikation von Proteinfaktoren, die mit der Promotorregion von *SAC1* interagieren. Hierfür sollten Methoden entwickelt werden, die für eine Aufreinigung solcher Faktoren geeignet sind.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des Promotors von *SAC1*

Die Lipidphosphatase Sac1p in Hefe ist an der Regulation vieler zellulärer Vorgänge beteiligt und muss daher selbst einer sehr genauen Regulation unterworfen sein. Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie die Expression des *SAC1*-Gens kontrolliert wird. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst der Promotor von *SAC1* analysiert. Im Vergleich zu anderen eukaryotischen Systemen, weisen die Promotoren von Hefegenen einen relativ einfachen Aufbau auf. So können die regulatorischen Elemente von Promotoren humaner Gene hunderte wenn nicht tausende Basenpaare vom Transkriptionsstart entfernt sein. Diese können zusätzlich an vielen unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sein, sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts, was eine Analyse zusätzlich erschwert. In Hefe befinden sich in der Regel alle wichtigen Elemente innerhalb der ersten 500 Basenpaare stromaufwärts des zu regulierenden Gens (Struhl, 1989; Struhl, 1995). Für die Analyse der Promotorregion von *SAC1* wurde daher angenommen, dass sich auch hier alle notwendigen Elemente innerhalb einer Region dieser Größe befinden. Für die vorliegende Arbeit wurde dieser Bereich als *SAC1*(-500/0) gekennzeichnet und allgemein als Gesamtpromotorregion bezeichnet. Um die Expression von *SAC1* zu analysieren, wurden zunächst Reportergene mit der Promotorregion von *SAC1* fusioniert, um die Aktivität des Promotors zu studieren.

2.1.1 Herstellung und Analyse von Reporterkonstrukten

2.1.1.1 Analyse eines Fusionsproduktes aus *SAC1*-Promotor und *LacZ*

LacZ ist ein Gen des bakteriellen Laktose-Operons und somit ein wichtiger Faktor in der Regulation des Laktosehaushalts. Es kodiert für das Enzym β -Galaktosidase welches Laktose in Galaktose und Glukose spaltet. Neben Laktose kann die β -Galaktosidase auch eine Reihe anderer Substrate, meist Derivate der Laktose, verwerten. Einige davon können als Farbindikator für die Aktivität des Enzyms eingesetzt werden. So wird das Galaktosid 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) von β -Galaktosidase in Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol gespalten, wobei letzteres zu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo oxidiert wird, ein unlösliches blaues Produkt. Zellen, die X-

Gal in dieses Produkt umwandeln, zeigen eine deutliche Blaufärbung.

Um die Promotorregion von *SAC1* mit dem *LacZ*-Reportergen zu fusionieren, wurde das Plasmid YCplac33 verwendet, ein CEN-basierter Vektor in dessen „multi cloning site“ (MCS) die *SAC1*-Gesamtpromotorregion eingebracht wurde. Das *LacZ*-Gen wurde aus dem Vektor pZL4024 ausgeschnitten und an das C-terminale Ende des *SAC1*-Promotors kloniert (Abb. 4A). Das resultierende Fusionsgen *SAC1(-500/0)-LacZ* wurde verwendet, um mit dem Substrat X-Gal die Aktivität des *SAC1*-Promotors zu testen. Bei aktivem Promotor färben sich Zellen auf X-Gal-haltigem Medium blau und ermöglichen so den visuellen Nachweis der Promotoraktivität.

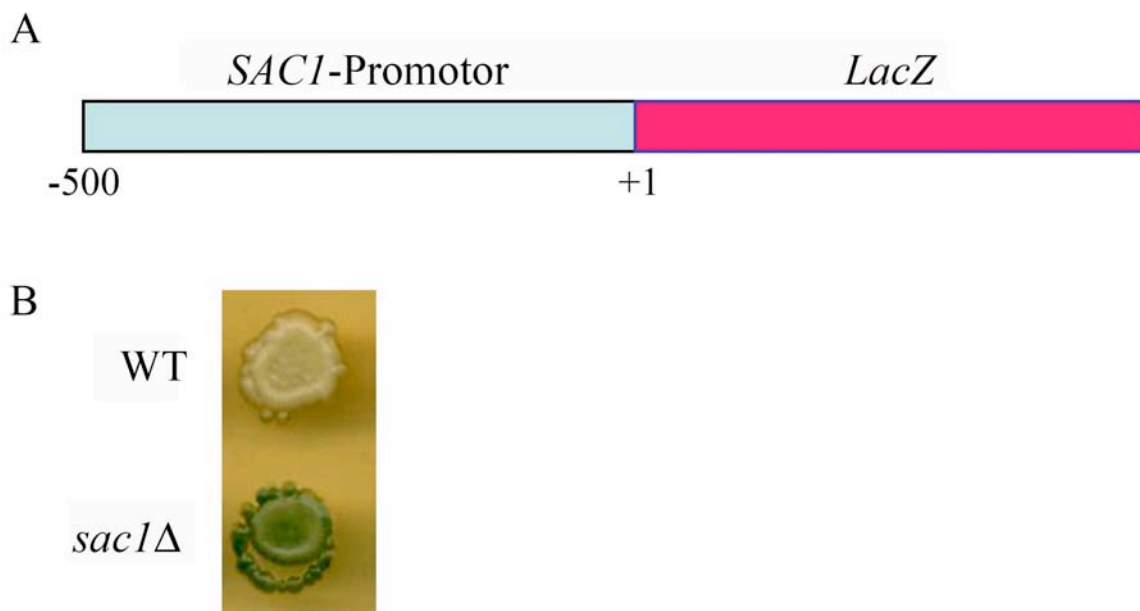


Abb. 4. A, schematische Darstellung des *SAC1*-Promotor-*LacZ*-Fusionsgens. B, Expression des *LacZ*-Fusionsgens in einem Wildtyp- und einem *sac1* Δ -Stamm. Die Promotoraktivität in *sac1*-Null-Zellen ist deutlich sichtbar erhöht.

Wie eingangs beschrieben, wurde zuvor beobachtet, dass in Hefezellen, die eine *SAC1*-Variante mit verringerter Phosphataseaktivität exprimieren, die zelluläre Menge dieses Proteins im Vergleich zu Sac1p in Wildtypzellen deutlich erhöht ist. Um zu testen, ob eine Sac1p-Defizienz Auswirkungen auf die Aktivität des *SAC1*-Promotors hat, wurde das Plasmid mit *SAC1(-500/0)-LacZ* sowohl in Wildtypzellen als auch in einen *sac1*-Null-Stamm eingebracht. Beide Stämme wurden auf X-Gal-haltigem Medium kultiviert. Es konnte beobachtet werden, dass *sac1*-Null-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen eine

deutlich stärkere Blaufärbung zeigten (Abb. 4 B). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivität des *SAC1*-Promotors in *sac1*-Null-Mutanten im Vergleich zu Wildtypzellen erhöht ist.

2.1.1.2 Analyse eines Fusionsproduktes aus *SAC1*-Promotor und GFP

Zusätzlich zur Analyse der *LacZ*-Aktivität unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors wurde ein Fusionskonstrukt aus *SAC1*-Promotor und GFP untersucht (Abb. 5A). Die Fusion mit GFP ermöglicht die visuelle Analyse zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des zu untersuchenden Proteins. Zusätzlich kann GFP mit Hilfe eines spezifischen Antiserums in einer Immunreaktion detektiert werden. So können Proteinmengen mit SDS-PAGE und anschließendem Westernblot bestimmt werden. Wie das *LacZ*-Konstrukt wurde auch das *SAC1*-Promotor-GFP-Konstrukt in Wildtyp- und *sac1* Δ -Zellen eingeführt. Hefezelleextrakte wurden präpariert und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die anschließende Immunreaktion mit

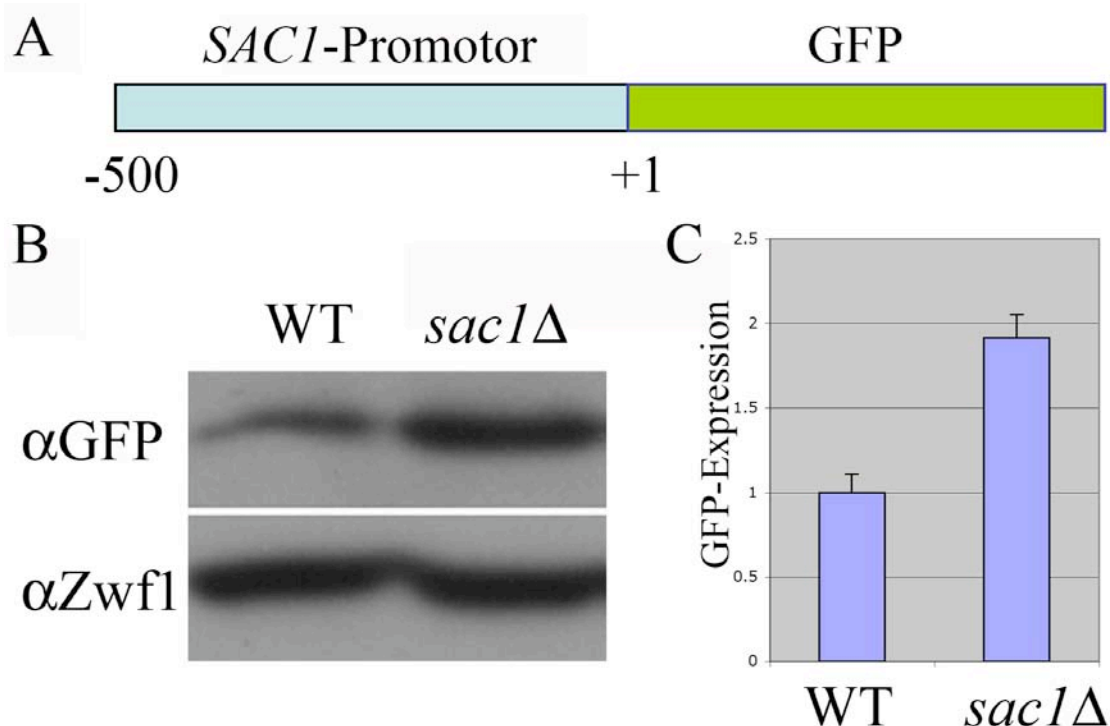


Abb 5. A, schematische Darstellung des *SAC1*-Promotor-GFP-Fusionsgens. B, Das Konstrukt wurde in einem Wildtyp- und einem *sac1*-Null-Stamm exprimiert und die intrazelluläre GFP-Menge durch Westernblotanalyse von zellulären Gesamtfractionen bestimmt. Ein Antiserum gegen die Hefe-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Zwf1p diente als Ladekontrolle. C, Quantifizierung der GFP-Expression mehrerer unabhängiger Experimente.

GFP-Antikörpern gab Aufschluss über die Abundanz des GFP in den zellulären Fraktionen. Wie Abbildung 5B zeigt, konnte GFP sowohl in Wildtypzellen als auch in den *sac1* Δ -Mutanten nachgewiesen werden. Auch hier war die Promotoraktivität in den *sac1*-Nullmutanten im Vergleich zu Wildtypzellen erhöht, was die deutlich stärkere GFP-Bande in der *sac1* Δ -Mutante zum Ausdruck bringt (Abb 8B). Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen das Hefeprotein Zwflp, das für eine Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodiert. Dieses Ergebnis bestätigt das vorangehende Resultat und zeigt, dass die Aktivität des *SAC1*-Promotors in *sac1*-Nullmutanten etwa zweifach erhöht war (Abb. 5C).

Als weitere Analyseverfahren wurden Wildtypzellen und *sac1* Δ -Zellen, die GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors exprimierten, unter dem Mikroskop analysiert. Auch hierbei konnte eine verstärkte Abundanz des GFP in den *sac1*-Nullmutanten beobachtet werden. Diese Zellen zeigten eine weitaus stärkere Fluoreszenz als Zellen, die Wildtyp-*SAC1* exprimierten (Abb. 6A). Die Analyse der Fluoreszenz mit Hilfe eines „Fluorescence-activated cell-sorters“ (FACS) hatte ähnliche Resultate zur Folge. Für *sac1*-Null-Zellen konnte eine etwa 1,5-fach höhere Autofluoreszenz gemessen werden (Abb. 6B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass beide Reportergene unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors in Zellen mit deletiertem *SAC1*-Gen eine erhöhte Aktivität des *SAC1*-Promotors nachweisen können. Im Folgenden wurde mit Hilfe einer Reihe von Deletionsmutanten des Promotors untersucht, welche Basenpaarbereiche innerhalb der *SAC1*-Promotorregion für eine aktive Transkription notwendig sind.

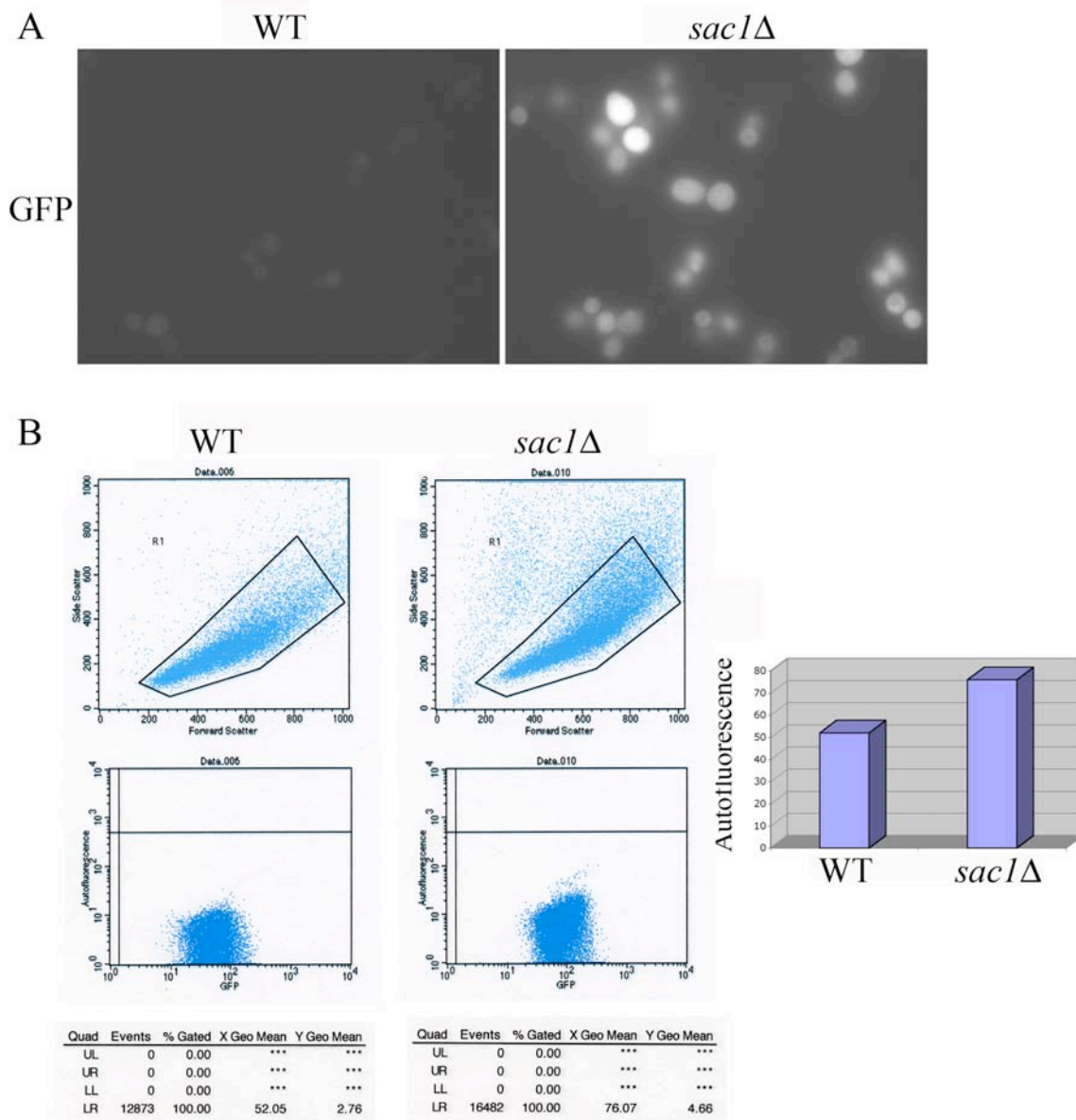


Abb. 6. A, Wildtypzellen und *sac1*-Null-Zellen, die GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors exprimierten, wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. B, Die Autofluoreszenz beider Stämme wurde mit Hilfe eines FACS gemessen.

2.1.2 Analyse von Promotordeletionen

Um die Promotorregion von *SAC1* genauer zu studieren, wurden verschiedene verkürzte Varianten des *SAC1*-Promotors mit Reportergenen fusioniert. Eine am 5'-Ende um 183 Basenpaare verkürzte Promotorregion wurde mit *LacZ* fusioniert (*SAC1*(-317/0)-*LacZ*). Als Kontrolle wurde am 3'-Bereich des Promotors 149 Basenpaare entfernt und das

resultierende Promotorstück *SAC1*(-500/-150) mit *LacZ* fusioniert. An Position (-50/-46) innerhalb der deletierten Basenpaare befand sich dabei die TATA-Box, an der die Assemblierung des Initiationskomplexes eingeleitet wird. Es wurde erwartet, dass ein um diesen Bereich verkürzter *SAC1*-Promotor keine oder nur wenig transkriptionelle Aktivität zeigt. Zur Konstruktion dieser beiden Deletionsmutanten wurden die entsprechenden Bereiche des *SAC1*-Promotors zuerst mittels PCR amplifiziert, in ein CEN-basiertes Plasmid eingebracht und anschließend das *LacZ*-Gen eingeführt (Abb 7A).

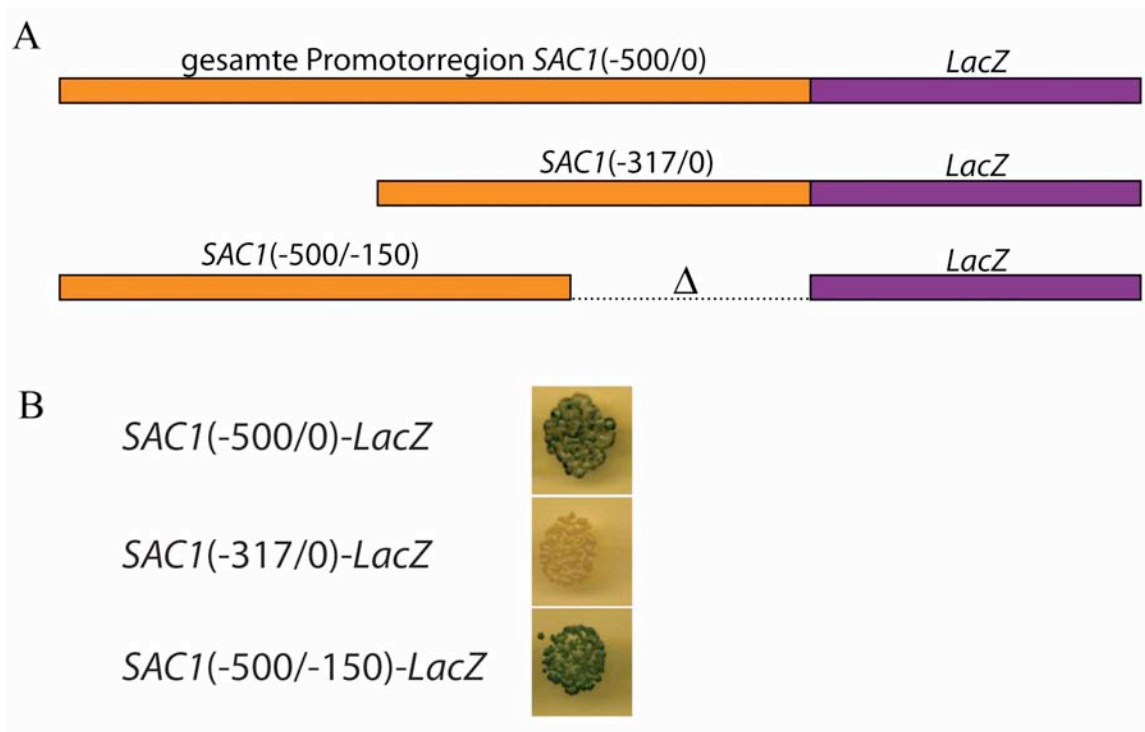


Abb 7. A, schematische Darstellung der verkürzten *SAC1*-Promotor-*LacZ*-Fusionsgene. B, Expression der Konstrukte in einem *sacI*-Null-Stamm. Die N-terminal verkürzte Variante zeigt ähnliche Aktivität wie der Gesamtpromotor, die Deletion am C-terminalen Bereich hat den Verlust der Promotoraktivität zur Folge.

Diese Deletionskonstrukte wurden dann in einen *sacI*-Null-Stamm transformiert und auf X-Gal-haltigen Agarplatten kultiviert. Der *sacI*-Null-Stamm wurde deswegen gewählt, da die Aktivität des Promotors in dieser Umgebung erhöht ist und die Analyse der Deletionsmutanten somit erleichtert wird. Wie Abbildung 7B ersichtlich macht, schien die Deletion am 5'-Ende der Promotorregion kaum Auswirkung auf die Aktivität des Promotors zu haben. Zellen, die das entsprechende Konstrukt *SAC1*(-317/0)-*LacZ*

exprimierten, zeigten ähnlich starke Farbreaktionen wie die Kontrollzellen mit Gesamtpromotorkonstrukt. Wurde *LacZ* unter der Kontrolle des am 3'-Terminus verkürzten *SAC1*(-500/-150)-Promotorstückes exprimiert, so ließ sich kaum oder nur wenig Farbentwicklung ausmachen. Wie erwartet hat das Fehlen der TATA-Box zur Folge, dass der Transkriptionsstart nicht initiiert werden kann und somit das *LacZ*-Gen nicht exprimiert wird. Es gibt Gene, die auch ohne TATA-Box exprimiert werden können, jedoch ist in den meisten Fällen eine vollständige TATA-Box für die Initiation der Transkription essentiell.

Zur weiteren Analyse des *SAC1*-Promotors wurden zusätzliche 5'-Deletionsmutanten konstruiert. Dabei wurden zunehmend mehr Basenpaare vom 5'-Ende entfernt. Jedoch wurde hierfür das Reportergen *LacZ* durch GFP ersetzt, da dies eine schnellere Analyse der Proteinlevel durch Westernblot mit anschließender Quantifizierung zulässt. Zur Konstruktion wurde das Plasmid pGK26 verwendet, welches die vollständige *SAC1*-Promotorregion an GFP fusioniert trägt. Die verkürzten Promotorabschnitte wurden mittels PCR amplifiziert und über einen Subklonierungszwischenschritt an Stelle des Gesamtpromotors in den pGK26-Vektor kloniert. Ausgehend von obiger *LacZ*-Analyse wurde für das längste Promotorfragment eine Länge von 242 Basenpaaren ausgehend

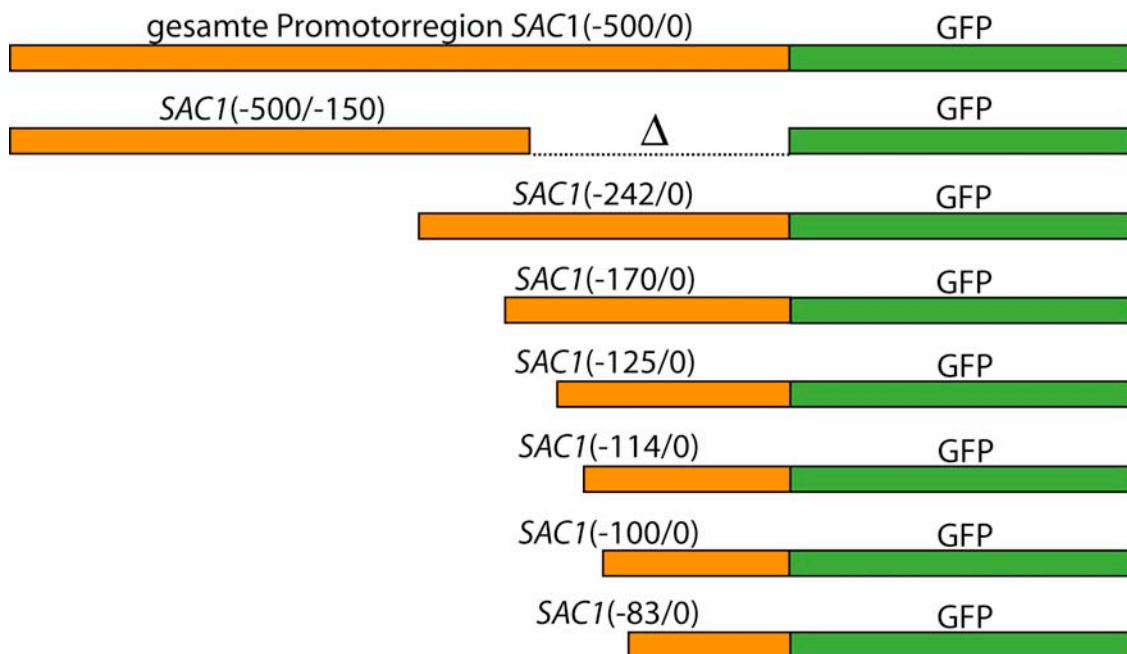


Abb. 8. schematische Darstellung der verkürzten Promotor-GFP-Fusionsgene.

vom 3'-Terminus gewählt. Sukzessives Verkürzen am 5'-terminalen Bereich dieser Region führte über mehrere Konstrukte schließlich zum kürzesten analysierten Konstrukt *SACI(-83/0)*-GFP, welches eine Länge von 83 Basenpaaren hatte. Alle konstruierten Deletionsmutanten sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

Zur Analyse wurden alle Konstrukte in Hefezellen eingebracht und mittels Zellaufschluss zelluläre Fraktionen präpariert. Die enthaltenen Proteine wurden über eine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und per Westernblot auf eine Membran übertragen. Die Immundetektion wurde mit Antisera sowohl gegen GFP als auch gegen Zwflp als Ladekontrolle durchgeführt (Abb 9).

Von den 5'-terminalen Deletionsmutanten zeigten alle bis auf *SACI(-83/0)* transkriptionelle Aktivität. Da selbst das zweitkürzeste Promotorkonstrukt *SACI(-100/0)* noch transkriptionell aktiv war, konnte geschlossen werden, dass der minimale Promotor innerhalb der ersten 100 Basenpaare stromabwärts des Startcodons liegt. Zusätzlich zur essentiellen TATA-Box scheint eine siebzehn Basenpaare umfassende Region zwischen den Positionen -100 und -84 wichtig für die Initiation der Transkription zu sein. Wurde diese Region vom Minimalpromotor entfernt, ging die Aktivität des Promotors gänzlich verloren. Betrachtete man die GFP-Expressionslevel unter der Kontrolle der unterschiedlichen Promotordeletionen, so war eine starke transkriptionelle Schwankung ihrer Aktivität zu beobachten. So war z. B. die Menge an GFP in Zellen mit dem minimalen Promotorkonstrukt *SACI(-100/0)* höher als in Zellen, die GFP unter der Kontrolle des 25 Basenpaar längeren Promotorfragments *SACI(-125/0)* exprimierten. Das 242 Basenpaar lange Fragment *SACI(-242/0)* zeigte sogar eine größere Aktivität als der Gesamtpromotor (Abb. 9). Eine Erklärung hierfür könnte das Wegfallen eines hemmenden Bereichs am 5'-Ende der Promotorregion sein. Des Weiteren lässt sich ein dramatisches Abfallen der Promotoraktivität feststellen, wenn die Promotorregion vom 5' terminalen Ende her sukzessiv verkürzt wird. So hat das Konstrukt *SACI(-125/0)* nur noch etwa die 0,3-fache Aktivität des Gesamtlängepromotors. Wird weiter verkürzt, so nimmt die Aktivität bis hin zum Minimalpromotor enthaltenden Konstrukt *SACI(-100/0)* wieder zu (Abb. 9).

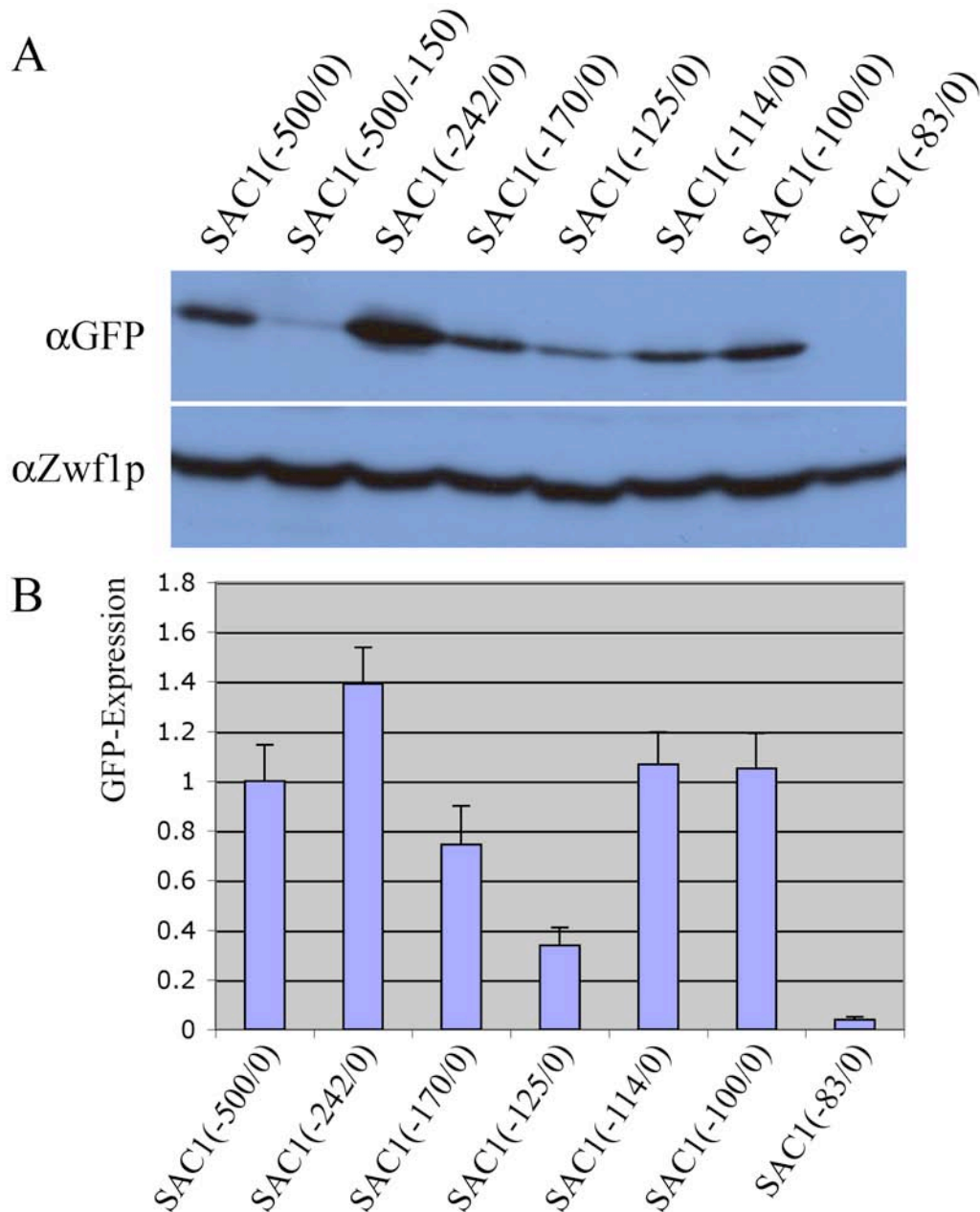


Abb. 9. A, die Aktivität der einzelnen Promotorstücke als Nachweis im Westernblot. Alle getesteten Konstrukte bis auf *SAC1(-83/0)* zeigen Promotoraktivität. Die Aktivität der 3'-Deletionsmutante *SAC1(-500/-150)* ist aufgrund des Fehlens der TATA-Box reduziert. B, Quantifizierung der Aktivität der einzelnen Promotordeletionen in Relation zur 500 Basenpaar umfassenden Wildtyppromotorregion.

Wie zuvor beobachtet wurde, zeigte der Gesamtpromotor von *SAC1* in *sac1* Δ -Zellen zweifach erhöhte Aktivität. Um zu testen, ob auch der minimale Promotor *SAC1(-100/0)* in seiner Aktivität regulierbar war, wurde das *SAC1(-100/0)*-GFP-Plasmid sowohl in

Wildtypzellen als auch in *sacI*-Null-Zellen eingebracht. Es konnte festgestellt werden, dass die Aktivität des 100 Basenpaare umfassenden Minimalpromotors in *sacI*-Null-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen etwa zweifach erhöht war (Abb. 10). Dies entsprach den Werten, die zuvor mit dem Gesamtpromotor gemessen wurden. Somit war ein Hinweis dafür gefunden, dass die als essentiell identifizierte Region zwischen den Basenpaaren -100 und -84 nicht nur für die Aktivität des Promotors, sondern auch für dessen Regulation wichtig ist.

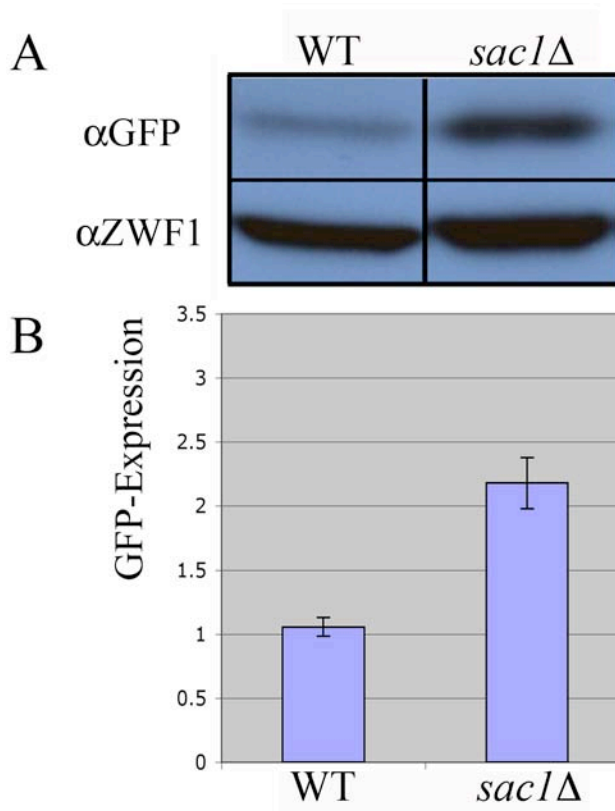


Abb. 10. A, Westernblot zum Nachweis der Expression von GFP unter der Kontrolle des minimalen *SACI*-Promotors *SACI*(-100/0). B, Quantifizierung der Expression von GFP in mehreren unabhängigen Experimenten.

Um die offenbar wichtige Region zwischen den Positionen -100 und -84 detaillierter zu charakterisieren, wurden zusätzliche Deletionsmutanten konstruiert. Hierzu wurden Basenpaare innerhalb des Gesamtlängepromotorbereichs deletiert. Zunächst wurde die gesamte fragliche Region zwischen den Basenpositionen -100 und -84 innerhalb der Gesamtpromotorregion gelöscht (Konstrukt *SACI*₅₀₀ \square (-100/-84)). Als Kontrolle wurde die Mutante *SACI*₅₀₀ \square (-83/-70) erzeugt, bei der 14 Basenpaare der flankierenden 5'-

Region gelöscht wurden. Die Abbildung 11A gibt einen schematischen Überblick über die beiden Deletionsmutanten.

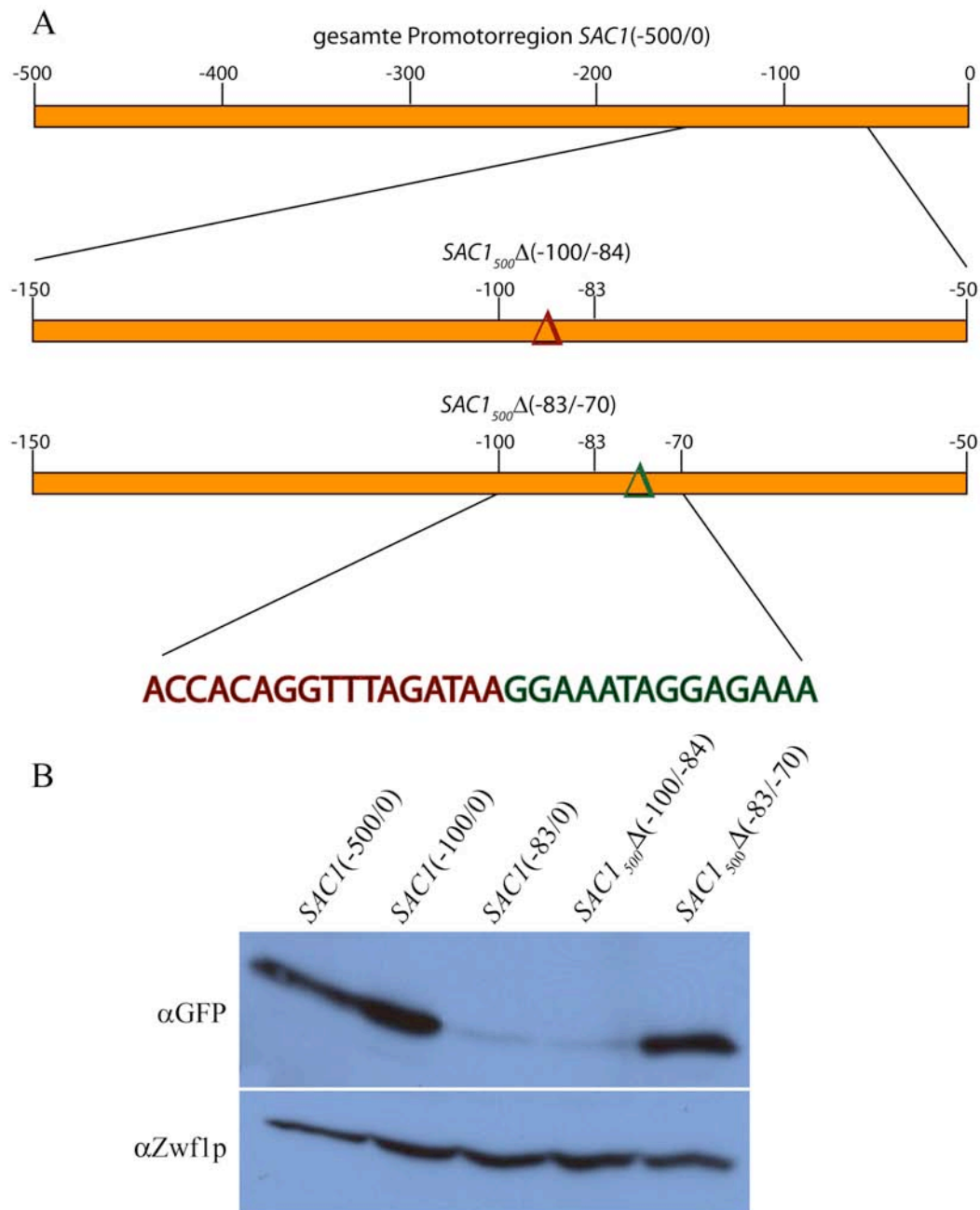


Abb. 11. A, Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte *SAC1*₅₀₀Δ(-100/-84)-GFP und *SAC1*₅₀₀Δ(-83/-70)-GFP. B, Analyse der Promotoraktivitäten der angegebenen verschiedenen Promotorvarianten von *SAC1* mittels SDS-PAGE und Westernblot.

Beide Konstrukte wurden in Hefezellen eingebracht und die Aktivität beider Promotor-konstrukte mittels Westernblot und Immundetektion analysiert. Die Ergebnisse hierbei

bestätigen die wichtige Funktion der 17 Basenpaare umfassenden Region. Wird diese aus dem Gesamtpromotor gelöscht, so ist die Aktivität nahezu bei Null. Werden stattdessen die an der 5'-Seite flankierenden Basenpaare gelöscht, so hat das keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität (Abb. 11B). Bei genauerer Untersuchung konnten innerhalb der 17 Basenpaare zwei palindromartige Sequenzen identifiziert werden (Abb. 12A). Die eine Sequenzstruktur weist das Palindrom ACC-GGT auf, wobei die drei palindromischen Basenpaare durch die Basen ACA getrennt sind. Das zweite Palindrom lautet

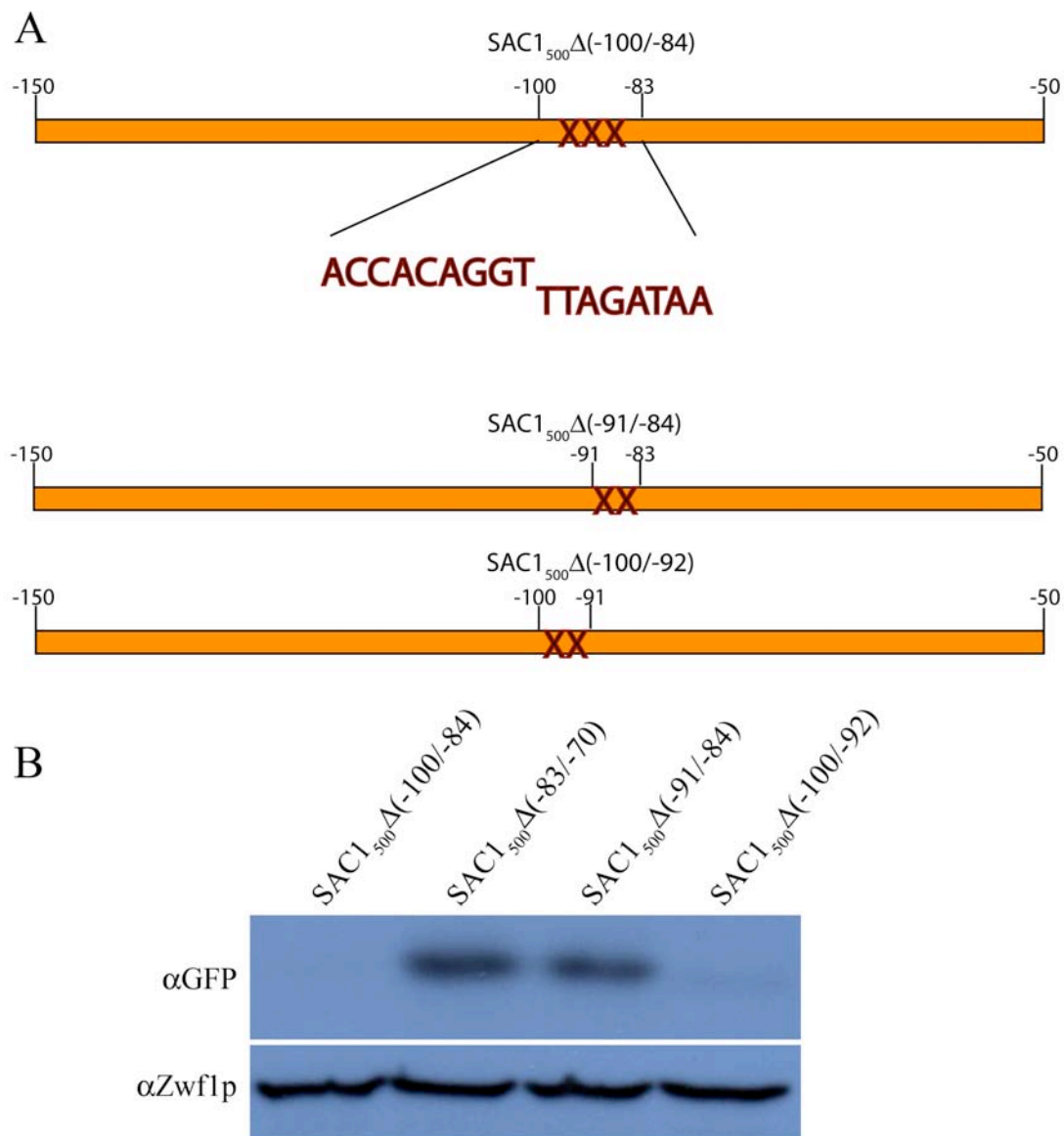


Abb. 12. A, Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte $SAC1_{500}\Delta(-91/-84)$ -GFP und $SAC1_{500}\Delta(-100/-92)$ -GFP. B, Analyse der Promotoraktivität der verschiedenen Deletionsmutanten mit SDS-PAGE und Westernblot.

TTA-TAA wobei auch hier eine räumliche Trennung der palindromischen Basen durch die Basen GA gewährleistet wird. Zur weiteren Charakterisierung wurden zwei weitere Deletionskonstrukte erzeugt, wobei jeweils eine der palindromartigen Sequenzen aus der Gesamtsequenz gelöscht wurde. Die resultierenden Konstrukte *SACI*₅₀₀Δ(-100/-92)-GFP und *SACI*₅₀₀Δ(-91/-84)-GFP wurden in Hefezellen transformiert und die Aktivität auf gleiche Weise wie zuvor getestet. Abbildung 12B zeigt die Aktivitäten der einzelnen Promotorversionen. Wurde die Region gelöscht, die die Basenpaare -91 bis -84 umfasste, so hatte dies keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Es konnten ähnlich hohe Mengen an GFP nachgewiesen werden wie mit der zuvor getesteten Mutante *SACI*₅₀₀Δ(-83/-70)-GFP. Wurde jedoch die Region zwischen den Basenpaaren -101 und -91 gelöscht, so hatte das den Verlust der Promotoraktivität zur Folge. Die Sequenz mit der Abfolge ACCACAGGT scheint für eine funktionale Transkription essentiell zu sein. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese Region des *SACI*-Promotors mit „electric mobility shift assays (EMSA)“ weiter untersucht.

2.1.3 Charakterisierung von Protein-DNA-Interaktionen mit „EMSA“

Zur Analyse von Proteinbindungen an DNA werden kurze Oligodeoxynukleotide, die eine spezifische Bindesequenz enthalten, radioaktiv markiert und mit Proteinfractionen inkubiert. Dabei binden Proteine spezifisch an ihre Bindedomäne der DNA. Diese Bindung wird durch einen „Bandshift“ mittels nativen Proteingelen sichtbar gemacht. Oligonukleotide, die Protein gebunden haben, laufen langsamer im Gel als ungebundene. So lassen sich direkt Interaktionen zwischen DNA und Proteinen untersuchen.

Für die Durchführung solcher Bandshiftanalysen wurde ein 39 Basenpaare umfassender Abschnitt der *SACI*-Promotorregion gewählt, der die zuvor identifizierte DNA-Sequenz enthielt (Template A, s. Abb. 13A). Einzelsträngige Oligonukleotide mit der angegebenen Sequenz wurden mit radioaktivem Phosphat markiert und anschließend mit komplementären unmarkierten Oligonukleotiden zu Doppelsträngen hybridisiert. Nach einem Protokoll von (Lopes and Henry, 1991) wurden aus Hefezellen lösliche zelluläre Gesamtfractionen präpariert. Hierfür wurden Zellen mit Glaskügelchen aufgeschlossen und die löslichen Proteine nach mehreren Zentrifugationsschritten mit Ammoniumsulfat gefällt und resuspendiert. Diese Gesamtextrakte wurden anschließend mit den

Oligonukleotiden inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente ohne die Zugabe von zellulären Gesamtfractionen durchgeführt. Um die Bindung von Proteinen an die

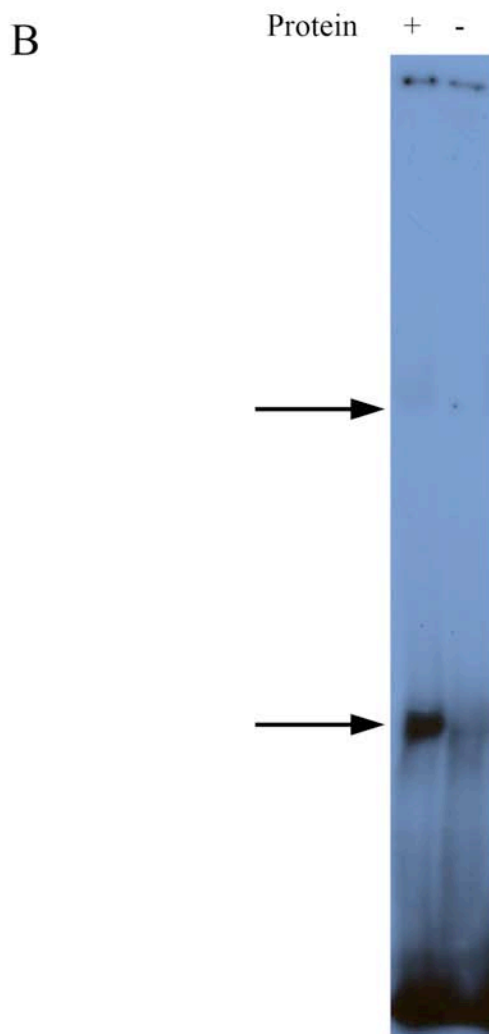
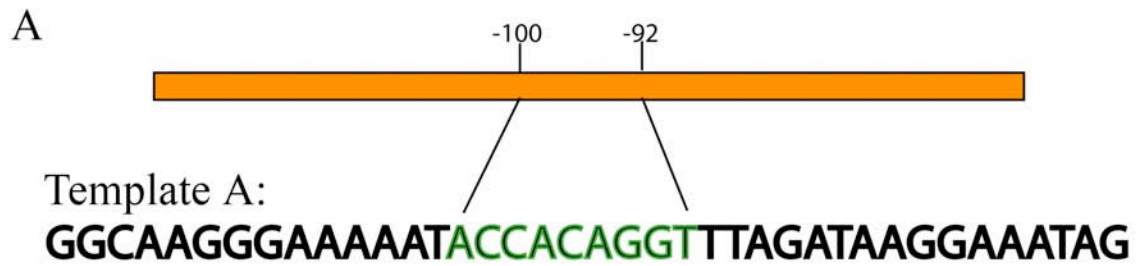


Abb. 13. A, Sequenz der radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotide. B, EMSA zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen mit dem spezifischen Oligonukleotid. In der linken Spur wurden 20 μ g Protein eingesetzt.

verwendeten Oligonukleotide zu analysieren, wurden die Reaktionsansätze mit Hilfe von nativen Proteingelen untersucht.

Wie in Abbildung 13B ersichtlich, konnten im nativen Gel zwei Banden detektiert werden, wobei die höher laufende nur relativ schwach sichtbar war. In Kontroll-experimenten ohne die Zugabe von löslichen zellulären Gesamtfractionen verschwinden beide Banden. Somit konnte *in vitro* für die eingesetzten Oligonukleotide eine Interaktion mit Proteinen nachgewiesen werden. Diese Proteine könnten beispielsweise Transkriptionsfaktoren sein, die die Aktivität des Promotors regulieren.

Als nächstes wurde die für eine *SAC1*-Expression essentielle Basenabfolge ACCACAGGT durch die Einführung verschiedener Basenmutationen weiter analysiert. Innerhalb der neun Basenpaare wurden jeweils drei nebeneinander liegende Basen durch ihre komplementären Basenpaare ersetzt. Zusätzlich wurden auf dieselbe Weise jeweils drei Basen außerhalb der essentiellen Region mutiert. Die so erhaltenen Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert, zu Doppelsträngen hybridisiert und für EMSA-Reaktionen eingesetzt (Templates M1 – M3, M5, M6). Abbildung 14A gibt eine Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide wieder; die getauschten Basenpaare sind dabei rot hervorgehoben. Es konnte gezeigt werden, dass das erste und dritte Basentriplett der Sequenz ACCACAGGT für eine effektive Protein-DNA-Interaktion besonders wichtig waren (Abb.14B). Wurden diese Basenpaare mutiert, so war die Bindung der Proteinfaktoren an die DNA stark reduziert. Wurden die mittleren drei Basenpaare ersetzt, war ebenfalls eine Reduktion in der Bindung zu beobachten, allerdings fiel diese weniger stark aus. Am wichtigsten schien das Basentriplett CCA zu sein. Wurde dieses getauscht, wurde eine Protein-DNA-Interaktion nahezu unterbunden. Wurden jeweils drei Basenpaare an den beiden angrenzenden Bereichen mutiert, schien dies keinen Einfluss auf die Interaktion mit Proteinen zu haben. Somit konnte gezeigt werden, dass die zuvor eingegrenzte Region ACCACAGGT nicht nur für die *SAC1*-Expression essentiell ist, sondern auch für eine effektive Interaktion mit Proteinen *in vitro*.

A

A GGCAAGGGAAAAATACCAACAGGTTTAGATAAGGAAATAG
M5 GGCAAGGGAAAATTAACCAACAGGTTTAGATAAGGAAATAG
M1 GGCAAGGGAAAAATGGACAGGTTTAGATAAGGAAATAG
M2 GGCAAGGGAAAAATACCTGTGGTTTAGATAAGGAAATAG
M3 GGCAAGGGAAAAATACCACACCATTAGATAAGGAAATAG
M6 GGCAAGGGAAAAATACCAACAGGTAATGATAAGGAAATAG

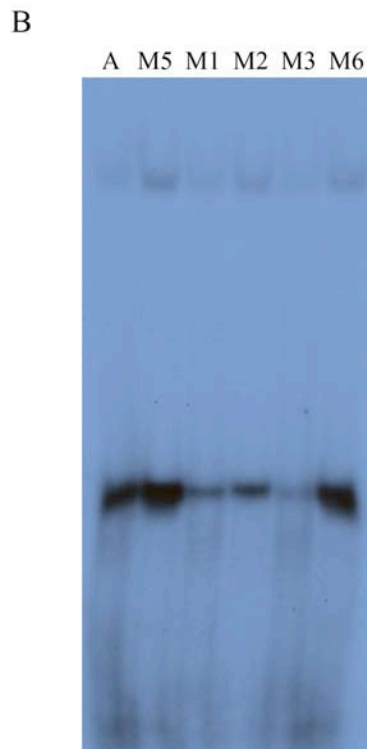


Abb. 14. A, Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Mutierte Basen sind farblich markiert. B, Gelshiftanalyse zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktionen mit den angegebenen Oligonukleotiden.

2.1.4 Affinitätsreinigung mit CNBr-aktivierter Sepharose

Im Folgenden wurde versucht, die an die verwendeten Oligodeoxynukleotide gebundenen Proteinfaktoren aufzureinigen. Hierzu wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Kadonaga and Tjian, 1986) verwendet. Komplementäre Oligodeoxynukleotide, welche die zuvor identifizierten Binderegion enthielten, wurden kombiniert, hybridisiert und zu Polymeren ligiert. Diese wurden dann kovalent an CNBr-aktiviertes Sepharosemedium gekoppelt. Zur Aufreinigung bindender Proteine wurde dieses anschließend mit löslichen zellulären Gesamtfractionen aus Hefezellen inkubiert (s. Abb. 15).

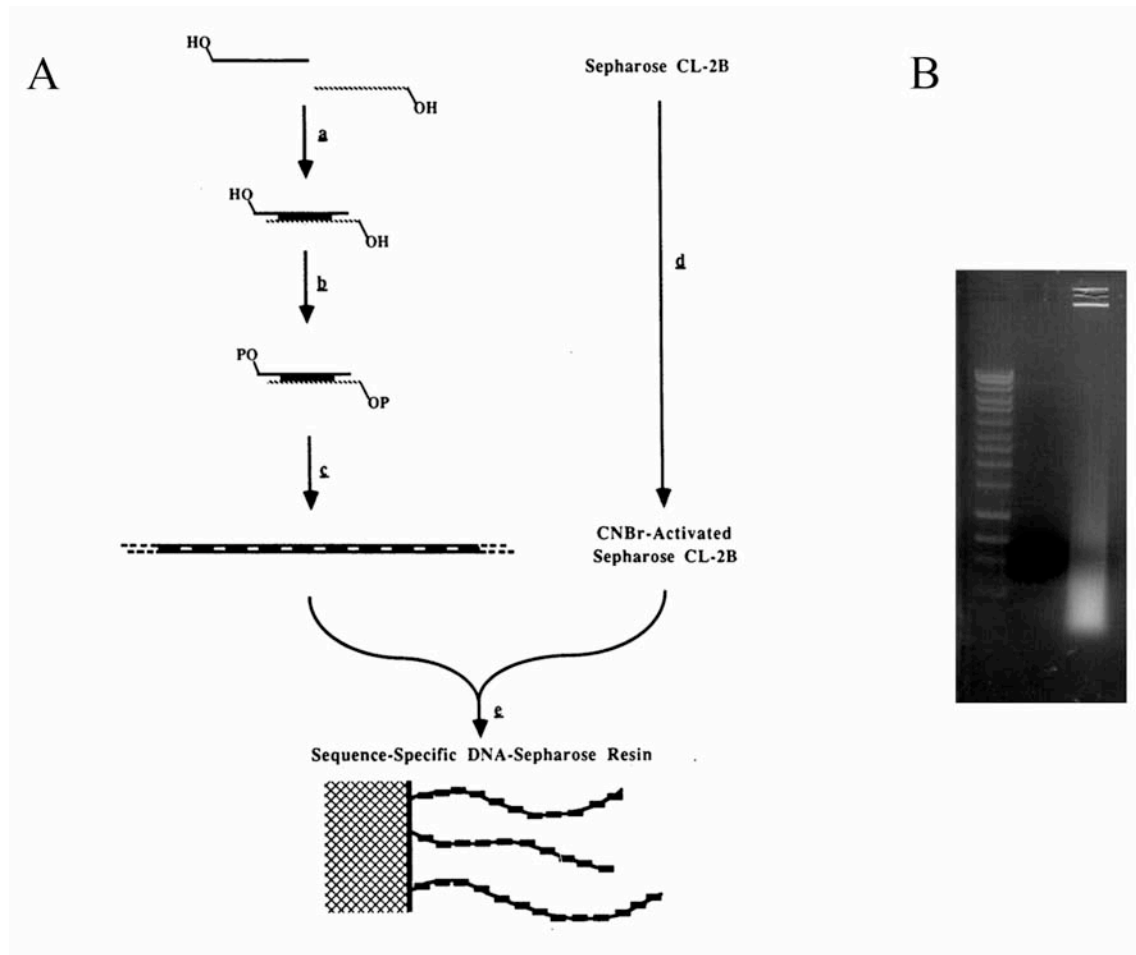


Abb. 15. A, Schematische Darstellung zur Präparation eines sequenzspezifischen DNA-Sepharosemediums; (Kadonaga and Tjian, 1986) entnommen. Komplementäre Oligodeoxy-nucleotide wurden hybridisiert, phosphoryliert und polymerisiert (a,b,c). Diese Polymere wurden anschließend kovalent an die aktiven Gruppen der Sepharose gekoppelt (e). B, Analyse der polymerisierten DNA mit 2% Agarose Gelelektrophorese. Die rechte Spur enthielt die Oligonucleotidpolymere.

Für die Präparation löslicher Proteingesamtfraktionen wurden wie zuvor Hefezellen aufgeschlossen und die löslichen Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt. Um die optimale Konzentration an Ammoniumsulfat zu bestimmen, wurde die Proteinfällung zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Diese wurden für EMSA-Reaktionen eingesetzt, um die Präsenz der Bindeaktivität in den einzelnen Fraktionen zu untersuchen (Abb. 16).

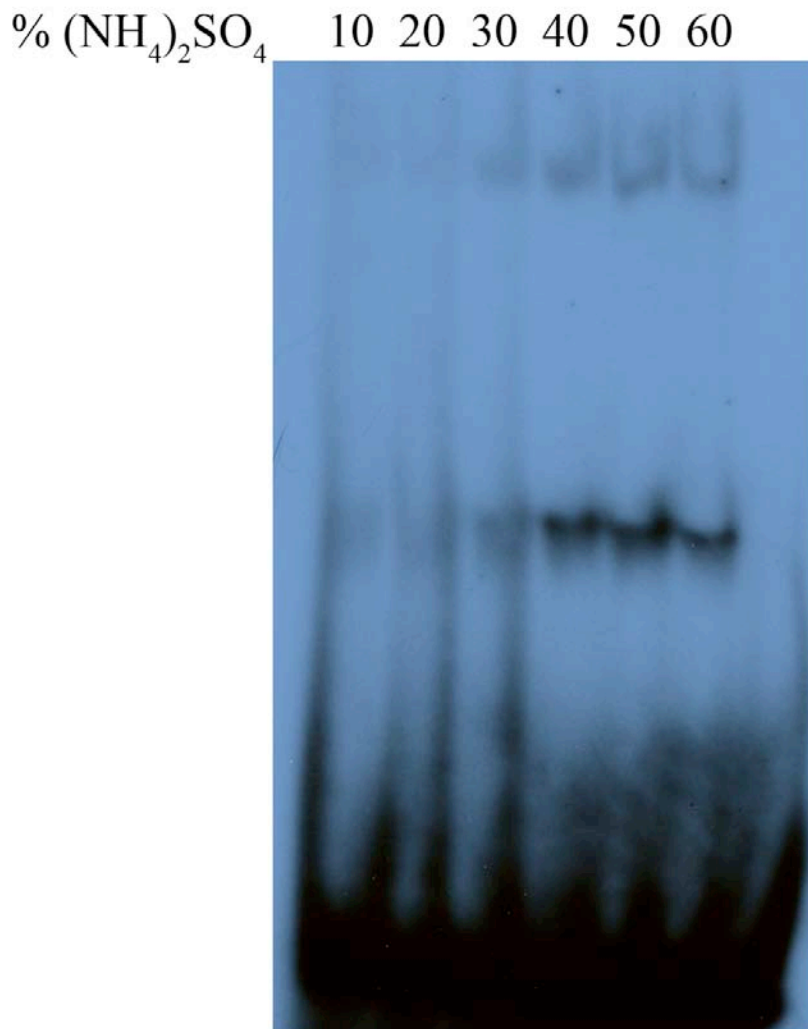


Abb. 16. Gelshift-Assay zur Bestimmung der optimalen Konzentration von Ammoniumsulfat zur Fällung des DNA-bindenden Proteins. Der EMSA wurde mit Oligodeoxynukleotiden, welche die spezifischen Bindungssequenz enthielten, und löslichen zellulären Gesamtfractionen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumsulfat gefällt wurden, durchgeführt.

Wie Abbildung 16 zeigt, konnte erst nach Fällung mit mindestens 40% Ammoniumsulfat eine klare Bande des spezifischen DNA-bindenden Proteins mittels Gelshift erhalten werden. Wurde mit niedrigeren Konzentrationen gefällt, war die Menge des gebundenen Proteins ungenügend. Im Folgenden wurde für die Präparation löslicher zellulärer Gesamtfractionen zur Vorreinigung zuerst mit 30% Ammoniumsulfat gefällt und die gefällten Proteine verworfen. Danach folgte ein Fällungsschritt mit 40% Ammoniumsulfat. Diese Proteinfraction wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Zunächst wurde getestet, ob die zuvor im Gelshift detektierten Proteine auch an spezifische Oligonukleotide banden, die zuvor polymerisiert und an Sepharose gekoppelt worden waren. Hierfür wurden lösliche zelluläre Proteinfractionen mit dem gekoppelten Sepharosemedium inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert und mit den Reaktionsüberständen Gelshiftreaktionen zum Nachweis der Bindeaktivität durchgeführt. Es wurde erwartet, dass nach erfolgter Bindung an die Sepharose keine

Vorbehandlung:	Sepharose	-	-	gekoppelt	un-gekoppelt
Gelshift: Proteinfraktion		-	+	+	+

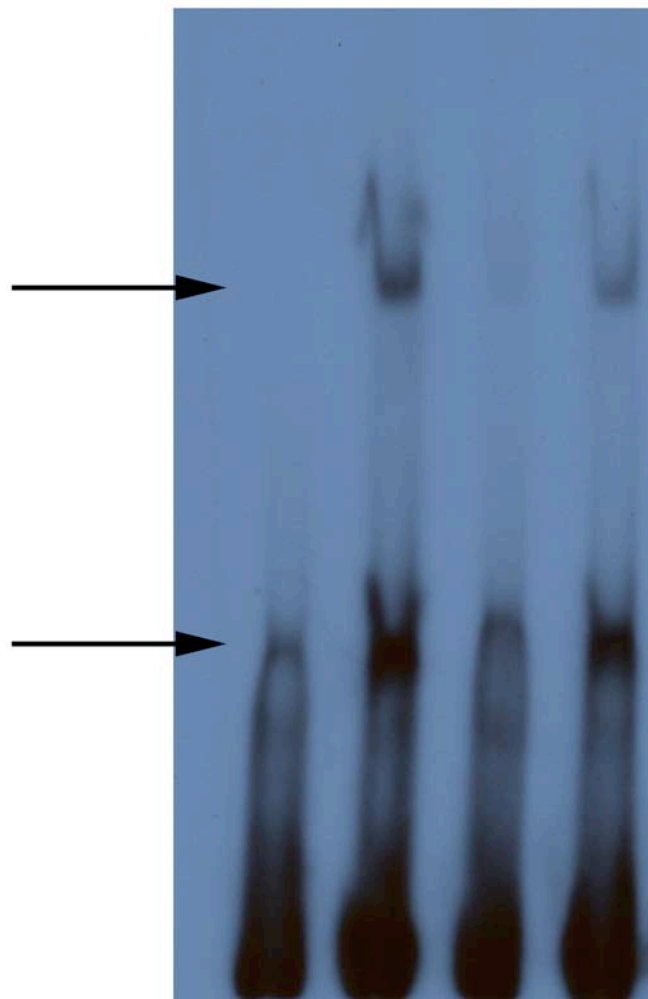


Abb 17. Gelshiftassay zur Analyse der Proteinüberstände nach Inkubation mit Sepharosekugeln. Für Reaktionen ohne Vorbehandlung wurde Proteinextrakt ohne Inkubation mit Sepharose für Gelshifts verwendet bzw. keine Proteinfraktionen eingesetzt. An ungekoppelte Sepharose waren keine spezifischen Oligonukleotide gekoppelt. In allen vier Ansätzen wurden gleiche Mengen Protein eingesetzt (125 µg).

Bindeaktivität im Überstand verblieben war. Als Kontrollreaktion wurden Proteinfractionen mit Sepharosekügelchen inkubiert, die nicht mit Oligonuklotiden gekoppelt worden waren. Zusätzlich wurden wie zuvor lösliche Proteinfractionen ohne Sepharosebehandlung für Gelshifts verwendet.

In der Tat konnte die Bindeaktivität aus Proteinfractionen entfernt werden, wenn diese mit spezifischen gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert wurden. Wurde der Reaktionsüberstand im Anschluss mit Gelshiftreaktionen untersucht, so konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden (Abb. 17). Wurden hingegen Sepharosekügelchen ohne gekoppelte Oligonukleotide eingesetzt, so verblieb die Aktivität im Überstand und konnte im Gelshift detektiert werden.

Als nächstes wurde getestet, ob die Bindung an die Oligonukleotide spezifisch war. Hierfür wurden lösliche zelluläre Proteinfractionen erneut mit gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert. Allerdings wurden zusätzlich freie spezifische Oligonukleotide im Überschuss zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Diese sollten mit den gekoppelten Oligonukleotiden um die Bindung der Proteine konkurrieren. War die Bindung der Proteine an die Oligonukleotide spezifisch, so sollte dadurch die Bindeaktivität im Reaktionsüberschuss erhalten bleiben. Zusätzlich wurden Kontrollreaktionen mit unspezifischen freien Oligonukleotiden durchgeführt. Hierfür wurde das Oligonukleotid M3 verwendet, das Basenmutationen innerhalb der essentiellen Bindungsregion trägt (vgl. Abb. 14). Wie erwartet verblieb die Aktivität der Bindung im Überstand, wenn spezifische Oligonukleotide im Reaktionsansatz enthalten waren. Diese unterbinden effektiv eine Bindung der Proteine an die gekoppelte Sepharose (Abb. 18). Waren keine freien Oligonukleotide anwesend, so wurde die Aktivität wie zuvor aus dem Überstand entfernt. Dies war auch dann der Fall, wenn unspezifische Oligonukleotide zur Reaktion zugefügt wurden. Diese waren nicht in der Lage, die Aktivität im Überstand zu erhalten. Die Bindung der Proteine war also spezifisch für Oligonukleotide mit der entsprechenden intakten potentiellen Bindesequenz.

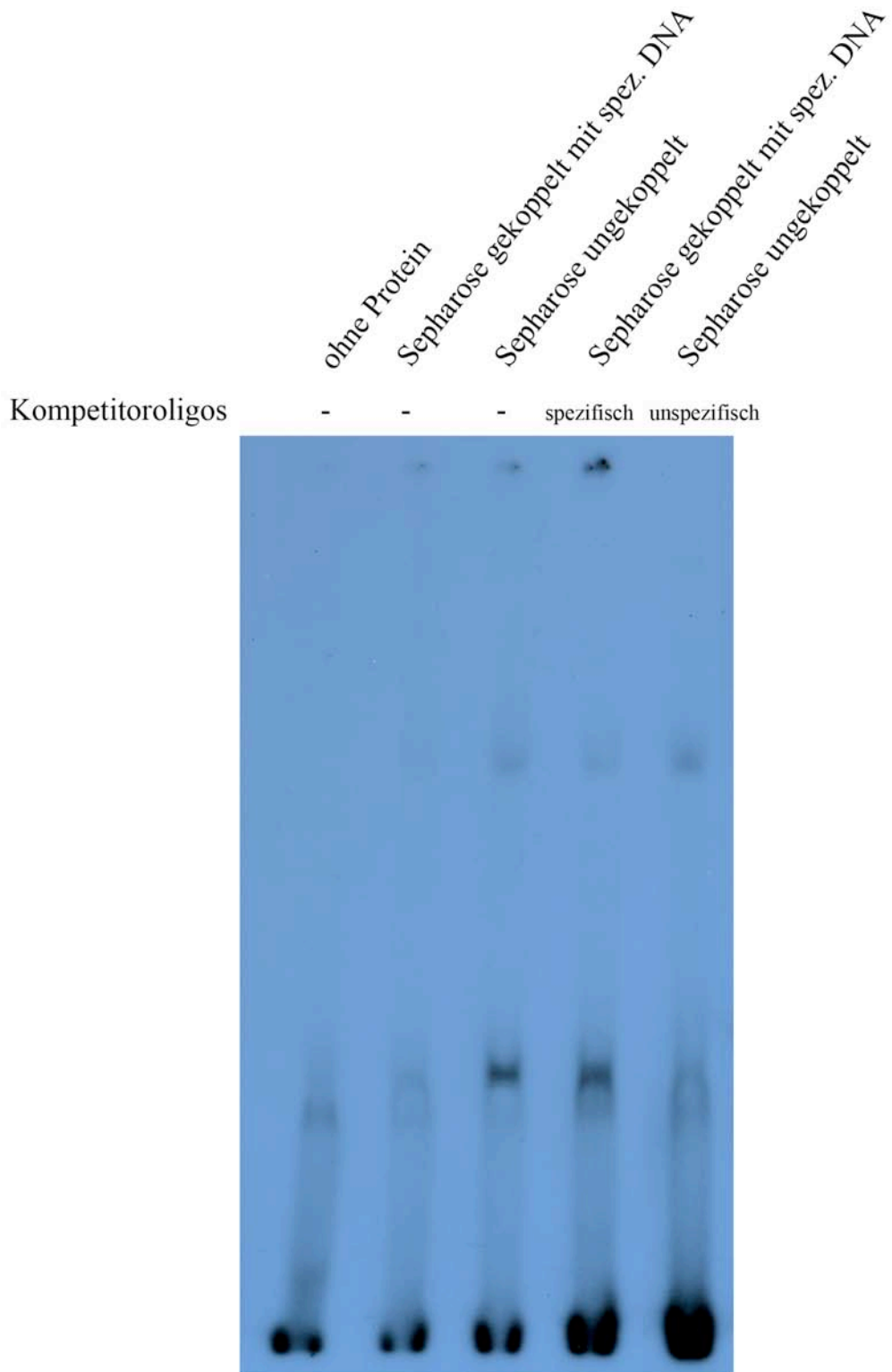


Abb. 18. Gelshiftassay zur Analyse der Proteinüberstände nach Inkubation mit Sepharosekügelchen. In allen Ansätzen wurden gleiche Mengen Protein eingesetzt (125 µg). Freie Kompetitoroligonukleotide wurden im zehnfachen Überschuss zugegeben. Sepharosekügelchen waren mit spezifischen Oligonukleotiden gekoppelt oder ungekoppelt.

Als nächstes wurde der Reaktionsansatz soweit aufskaliert, um genügend Protein für eine Identifikation durch Massenspektrometrie aufzureinigen. Hierfür wurden 1,25 mg Protein eingesetzt und die Inkubation mit gekoppelten Sepharosekügelchen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von freien kompetitiven Oligonukleotiden durchgeführt. Die Sepharosekügelchen wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt, gebundene Proteine durch Aufkochen denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Sypro-Orange gefärbt.

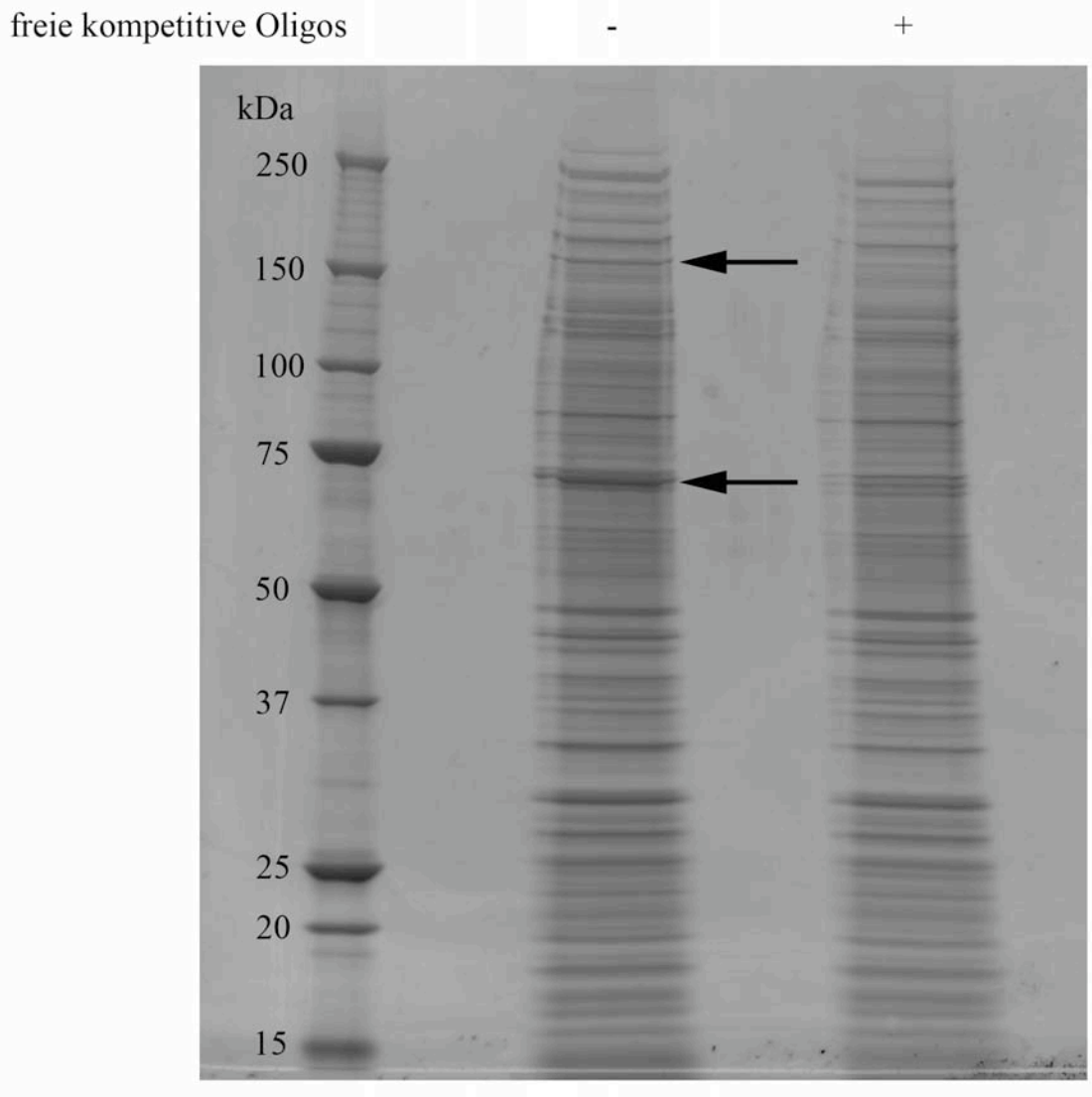


Abb. 19. Sypro-Orange gefärbtes SDS-Gel. Sepharosekügelchen mit gekoppelten DNA-Polymeren wurden unter An- bzw. Abwesenheit von kompetitiven Oligonukleotiden mit Proteinlösung inkubiert und die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Zwei Proteinbanden (Pfeile) konnten identifiziert werden, die selektiv an die an Sepharose gekoppelten Oligonukleotide gebunden waren. Zugabe von freien kompetitiven Oligonukleotiden zum Reaktionsansatz unterband die Bindung an die Sepharose.

Im Reaktionsansatz ohne freien Kompetitor konnten zwei Proteinbanden ausgemacht werden, die spezifisch an die Sepharosekügelchen gebunden waren. Ihre Bindung an Sepharose konnte im Kontrollexperiment durch Zugabe von Kompetitoroligonukleotiden unterbunden werden (Abb. 19). Diese beiden Banden wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die enthaltenen Proteinfragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. Zusätzlich wurden die entsprechenden Gelbereiche aus der Kontrollspur ausgeschnitten und auch hier die enthaltenen Proteine identifiziert. Bei der höher laufenden Bande mit einer Größe von ca. 160 kDa handelte es sich um die „DNA-directed RNA-Polymerase III“. Die massenspektrometrische Analyse konnte 14 Peptide identifizieren, deren Sequenzen in diesem Protein enthalten waren. Im Kontrollbereich waren keine Peptide dieses Proteins vorhanden. Die niedriger laufende Bande mit einer Größe von etwa 70 kDa repräsentiert den „replication factor A“. Hier konnten insgesamt 25 Peptide mit Sequenzübereinstimmung gefunden werden. Der Kontrollbereich lieferte lediglich 3 Peptide mit übereinstimmenden Sequenzen. Zusätzlich konnten in allen ausgeschnittenen Bereichen noch eine Reihe von Chaperonen gefunden werden. Obwohl keines der beiden identifizierten Proteine der gesuchte Transkriptionsfaktor war, konnte gezeigt werden, dass dieser experimentelle Ansatz für eine Anreicherung DNA-bindender Proteine durchaus verwendet werden kann. Da Transkriptionsfaktoren oft nicht abundant in der Zelle vorhanden sind, könnten höhere Aufskalierungen des Experiments notwendig sein.

2.2 Untersuchungen zur funktionellen Regulation der *SAC1*-Expression

Ein weiterer Aspekt meiner Arbeit war die Charakterisierung funktioneller Regulationsmechanismen des *SAC1*-Promotors. Hierbei sollten die Auswirkungen verschiedener Umgebungsvariablen auf die Aktivität des Promotors und somit die Expression des *SAC1*-Gens analysiert werden.

2.2.1 Auswirkungen von ER-Stress auf die *SAC1*-Promotoraktivität

Zunächst wurde der Einfluss von ER-Stress auf die *SAC1*-Expression untersucht. Der Einfluss von Stresssituation allgemein setzt intrazelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung stressmindernder Proteine in Gang. Diese Kaskaden können dabei lokal der Stressminderung einzelner Kompartimente dienen. Steht zum Beispiel das

endoplasmatische Retikulum unter Stress, so wird die so genannte „unfolded protein response“ (UPR) aktiviert. Auslöser für die UPR sind in der Regel verschiedene Umgebungsbedingungen, die eine korrekte Proteinfaltung im ER unterbinden. Die UPR aktiviert eine Reihe von Proteinen, die zum einen die Proteintranslation verlangsamen oder unterbinden, und zum anderen bei der korrekten Proteinfaltung unterstützend wirken bzw. falsch gefaltete Proteine entfernen. Auch für Sac1p existiert eine direkte Verbindung zur UPR. So wurde gezeigt, dass die Deletion von *SAC1* aus dem Hefegenom die Aktivierung der UPR zur Folge hat (Kochendörfer et al., 1999). Da die Aktivität des *SAC1*-Promotors in *sac1*-Null-Stämmen signifikant erhöht ist, stellte sich die Frage, ob der *SAC1*-Promotor unter der Kontrolle von UPR-induzierten Transkriptionsfaktoren steht. Um dies zu testen, wurde in Wildtypstämmen durch Zugabe von DTT in das Medium künstlich ER-Stress erzeugt und anschließend die Promotoraktivität analysiert. Hierzu wurden sowohl der mit *LacZ* als auch der mit GFP fusionierte Gesamtpromotor verwendet (Abbildung 20). Das *SAC1*(-500/0)-GFP-Plasmid wurde in Wildtypzellen sowohl unter stressfreien als auch unter stressinduzierten Bedingungen exprimiert, zelluläre Fraktionen präpariert und die GFP-Mengen mittels

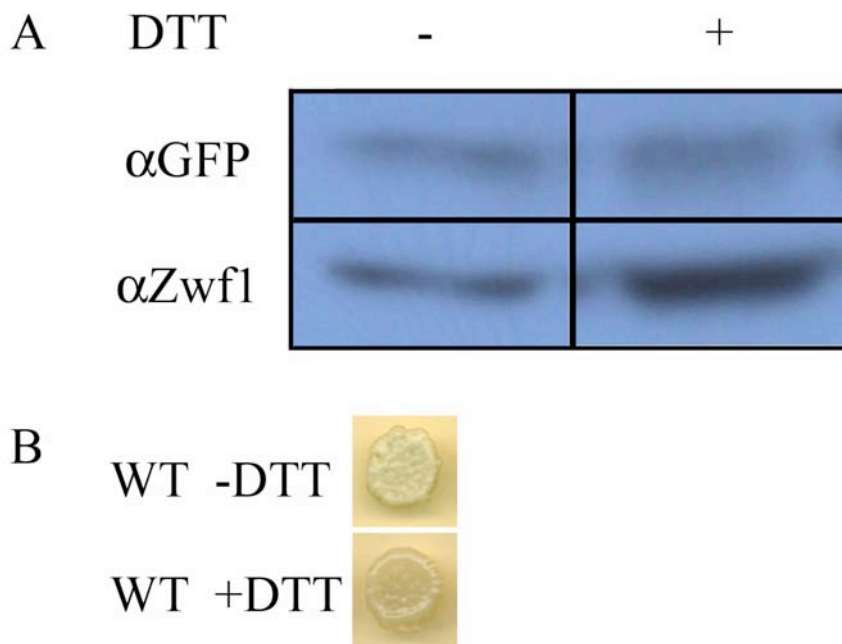


Abb. 20. Untersuchung der Aktivität des *SAC1*-Promotors unter dem Einfluss von ER-Stress. A, Expression von GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors unter Stress und stressfreien Bedingungen. B, Analyse der Aktivität des *LacZ*-Gens unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors unter Stress und stressfreien Bedingungen.

Westernblot und Immundetektion bestimmt. Wie Abbildung 20A zeigt, sind die Mengen an GFP in Zellen unter ER-Stress im Vergleich zu stressfreien Wachstumsbedingungen nicht erhöht. Zum selben Ergebnis kommt die Analyse des *SACI(-500/0)-LacZ*-Konstrukts. Zellen, die dieses Konstrukt exprimieren und auf DTT-enthaltenden Agarplatten kultiviert wurden, zeigen kaum oder keine Farbreaktion, ähnlich wie die Zellen auf DTT-freiem Medium. Somit konnte gezeigt werden, dass der *SACI*-Promotor nicht unter der Kontrolle der UPR steht. Die erhöhte Aktivität, die in *sacI*-Null-Stämmen beobachtet wird, hat demzufolge eine andere Ursache.

2.2.2 Abhängigkeit der *SACI*-Expression von zellulärem Inositol

Neben der Proteinfaltung im ER ist auch der Lipidstoffwechsel hoch reguliert. Inositol spielt dabei eine wichtige Rolle, da dieses Molekül als Vorstufe vieler Lipidmoleküle dient. Die Regulation des Lipidstoffwechsels ist dabei direkt an Inositol gekoppelt. Sind die zellulären Inositolmengen limitiert, werden Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung von Strukturgenen für die Lipidsynthese aktiviert. Es scheint eine direkte Verbindung zwischen der inositolbasierten Lipidsynthese und den Funktionen von *Sac1p* zu existieren. So konnte gezeigt werden, dass *sacI*-Nullmutanten nicht in inositolfreien Medien überleben können (Whitters et al., 1993). Jedoch wird dieser letale Phänotyp weder durch Defekte in der Inositolbiosynthese noch durch einen Defekt in der darauf folgenden Synthese von Phosphatidylinositol hervorgerufen. (Whitters et al., 1993). Die Inositolauxotrophie von *sacI* Δ -Zellen muss also auf andere Weise an den Lipidstoffwechsel geknüpft sein. Um zu testen, ob die *SACI*-Expression einer Regulation durch Inositol unterliegt, wurde das *SACI(-500/0)-GFP*-Plasmid in Wildtypzellen unter verschiedenen Inositolkonzentrationen im Wachstumsmedium exprimiert. Standardkonzentration war dabei 11 μ M, für erhöhte Mengen wurde das Medium mit 75 μ M Inositol supplementiert. Zusätzlich wurde inositolfreies Medium verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass unter inositolfreien Wachstumsbedingungen die Aktivität des *SACI*-Promotors deutlich erhöht war (Abb. 21). Wurde zum Medium siebenfach erhöhte Mengen an Inositol zugegeben, so waren die detektierten Mengen an GFP signifikant erniedrigt.

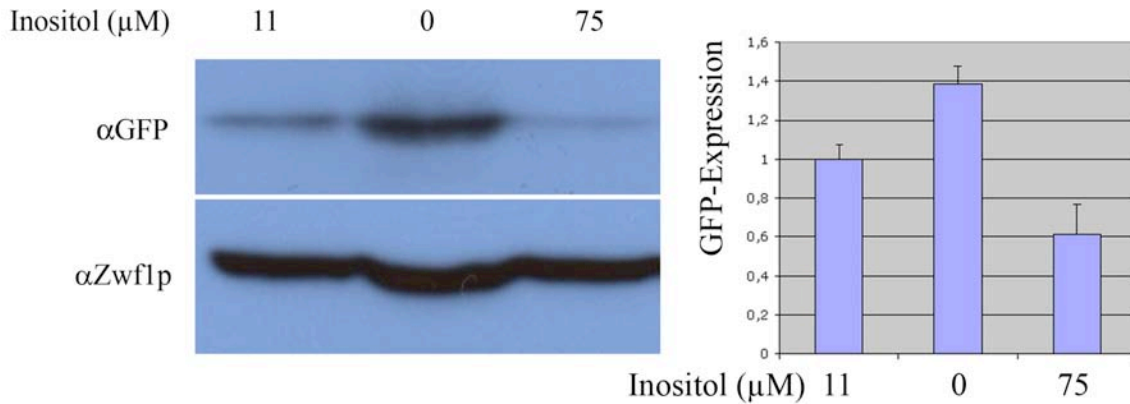


Abb. 21. A, GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors wurde unter Zugabe der angegebenen Mengen Inositol in Wildtypzellen exprimiert und mittels Westernblot detektiert. B, Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente als grafische Darstellung.

Diese Daten deuten daraufhin, dass der *SAC1*-Promotor inositolsensitiv ist. Zusätzlich zur Inositolauxotrophie der *sac1*-Nullmutante ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass *SAC1* eine Rolle beim Lipidstoffwechsel spielt. Eventuell wird die Regulation der *SAC1*-Expression von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die auch an der Steuerung der Lipidsynthese beteiligt sind. Im Laufe der letzten Jahre wurde die Regulation der inositolbasierten Lipidsynthese detailliert untersucht und beschrieben. So spielen die Transkriptionsfaktoren Ino2p, Ino4p und der Repressor Opi1p eine wesentliche Rolle bei der Regulation der für den Aufbau von Phospholipiden notwendigen Strukturgene. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Sac1p und Opi1p wurde bei der Analyse von „Microarray“-Experimenten zur Charakterisierung der UPR entdeckt. So wurde gezeigt, dass die Expression von *OP11* erniedrigt war während die Expression von *SAC1* gleichzeitig erhöht war (Travers et al., 2000). Zusätzlich ist bekannt, dass die Deletion von *OP11* eine Erhöhung der intrazellulären Mengen von Inositol zur Folge hat, da die verantwortlichen Strukturgene nicht mehr reprimiert werden (Carman and Henry, 1989; Greenberg et al., 1982). Da in *sac1*-Null-Zellen die Aktivität des *SAC1*-Promotors deutlich erhöht war und zusätzlich eine Inositoluxotrophie beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob die zellulären Inositolmengen in *sac1*-Null-Zellen erniedrigt waren. Ist dies der Fall, könnte eine Deletion von *OP11* die beobachteten Effekte umkehren. Um dies zu untersuchen, wurde das *OP11*-Gen sowohl in einem Wildtypstamm als auch in einem *sac1*-Null-Stamm deletiert.

2.2.3 Genetische Interaktion von *SAC1* und *OPI1*

2.2.3.1 Die Deletion von *OPI1* komplementiert die Inositolauxotrophie von *sac1* Δ -Stämmen

Zunächst wurde getestet, ob die Inositolauxotrophie von *sac1*-Null-Zellen durch die Kombination mit einer *OPI1*-Deletion komplementiert werden kann. Hierfür wurden Verdünnungsreihen von Wildtypzellen, *sac1*-Null-Zellen, *opi1*-Null-Zellen und *sac1-opi1*-Doppelnul-Zellen auf inositolfreiem Medium kultiviert. Wie erwartet waren die *sac1*-Nullzellen unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig (Abb. 22). Der Wildtypstamm und der *opi1*-Null-Stamm zeigten normales Wachstum. Wurde die Deletion von *SAC1* mit der Deletion von *OPI1* kombiniert, so konnte die Wachstumsfähigkeit auf inositolfreiem Medium wiederhergestellt werden. Das Wachstum der Doppelmutante ist nahezu vergleichbar mit dem von Wildtypzellen. Durch die erhöhte Inositolproduktion aufgrund der Deletion von *OPI1* wurden die intrazellulären Inositolmengen auf ein Niveau erhöht, das den *sac1*-Null-Zellen zum Wachstum genügt.

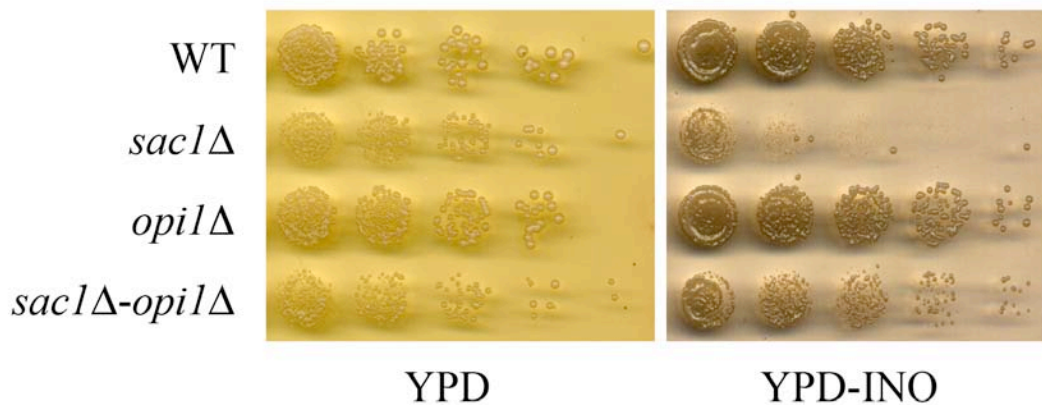


Abb. 22. Verdünnungsreihen der angegebenen Hefestämme wurden auf inositolfreien Medien ausplattiert. Als Wachstumskontrolle dienten Nährplatten mit YPD.

2.2.3.2 Die Deletion von *OPI1* erhöht die *SAC1*-Promotoraktivität in *sac1* Δ -Stämmen

Wie zuvor beobachtet worden war, konnte die Aktivität des *SAC1*-Promotors durch Entfernen von Inositol aus dem Wachstumsmedium erhöht werden. Die Zugabe von erhöhten Inositolmengen hatte dagegen eine Erniedrigung der Promotoraktivität zur Folge (vgl. Abb. 21). Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Inositolproduktion durch

die Deletion von *OP11* ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität des *SAC1*-Promotors zeigte. Um dies zu testen, wurde das Reporterplasmid *SAC1(-500/0)-GFP* sowohl in den *opi1*-Null-Stamm als auch in den *sac1-opi1*-Doppelnullstamm eingeführt. Um die Expression von GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors zu studieren, wurden von allen Stämmen Zellextrakte präpariert und diese mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion analysiert.

Wie Abbildung 23 zeigt, hatte die Deletion des *OP11*-Gens im Wildtypstamm keinen Einfluss auf die Aktivität des *SAC1*-Promotors. Die Expression von GFP in diesen Zellen war ähnlich stark wie im Wildtyp.

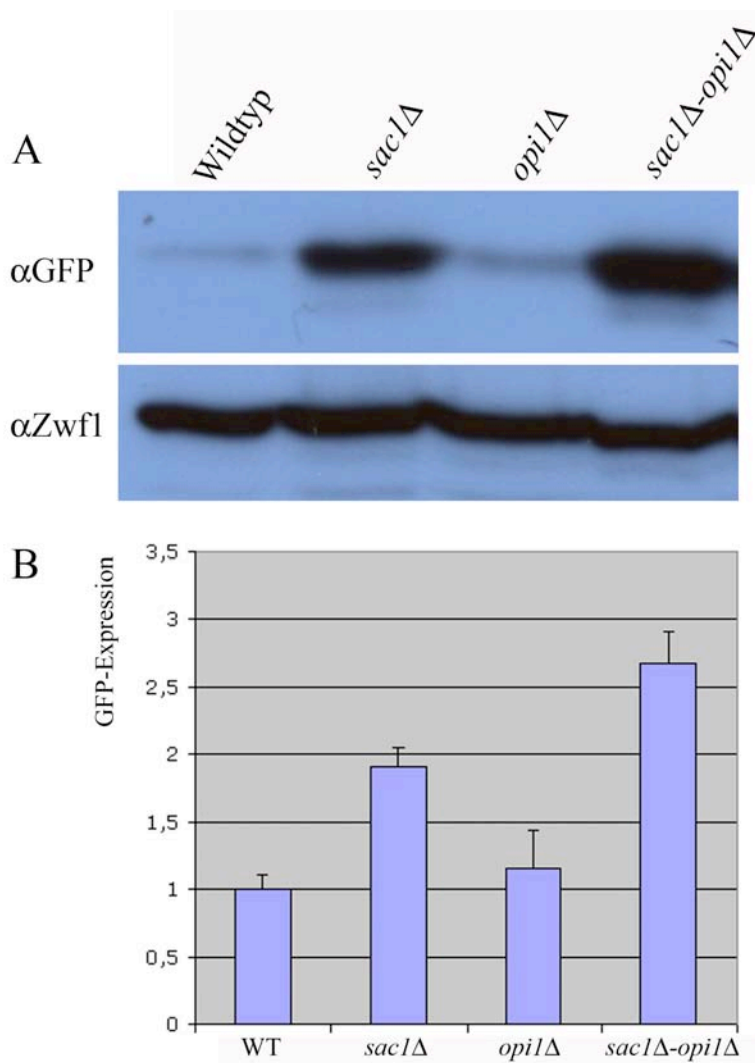


Abb. 23. A, Zellextrakte der angegebenen Stämme wurden präpariert und die Expression von GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors mittels Westernblot und einem Antiserum gegen GFP analysiert. B, Die GFP-Mengen in mehreren unabhängigen Experimenten wurden quantifiziert und in Relation zum Wildtypstamm schematisch dargestellt.

Offensichtlich war die erhöhte Inositolproduktion durch die Deletion von *OPII* nicht stark genug, um diesen Effekt zu erzielen. Wurde *OPII* im *sac1* Δ -Hintergrund deletiert, und somit die Inositolproduktion in diesen Zellen erhöht, so hatte dies überraschenderweise nicht die vermutete Erniedrigung der Promotoraktivität zur Folge, sondern die Aktivität des *SAC1*-Promotors war in der Doppelmutante zusätzlich erhöht (Abb. 23). Der Inositolstoffwechsel scheint mit der Regulation des *SAC1*-Promotors verknüpft zu sein, jedoch ist Inositol nicht der direkte Regulator. Zusätzliche Bedingungen wie eine möglicherweise direkte Interaktion mit Opi1p könnten hierbei von Bedeutung sein.

2.2.3.3 Opi1p interagiert nicht direkt mit der Promotorregion von *SAC1*

Um ein Indiz dafür zu erhalten, ob Opi1p direkt an die Promotorregion von *SAC1* bindet, wurden die verschiedenen Promotordeletionskonstrukte (s. Abb. 8) sowohl in *sac1* Δ -Zellen als auch in der *sac1* Δ -*opi1* Δ -Doppelmutante eingebracht und ihre Aktivitäten analysiert. Wie zuvor wurden hierzu Zellextrakte präpariert und die GFP-Mengen mittels Westernblot und eines GFP-spezifischen Antiserums detektiert. Zuvor wurde gezeigt, dass die verschiedenen verkürzten Promotoren unterschiedlich hohe Aktivitäten aufweisen (s. Abb 9). Es konnte beobachtet werden, dass einige der verkürzten Promotoren einen dramatischen Rückgang in ihrer Aktivität erfuhren. Erst nach weiteren Deletionen am 5'-Bereich erreichte die Aktivität wieder ein höheres Niveau. Dieses beobachtete Aktivitätsschema könnte als Hinweis dafür dienen, dass ein Repressor an den Promotor bindet und hemmend auf dessen Aktivität einwirkt. Wird dessen Bindungsregion entfernt, könnte dies für den Anstieg der Aktivität verantwortlich sein. Sollte Opi1p dieser hemmende Faktor sein, dann sollte die Entfernung des *OPII*-Gens aus dem Genom eine Änderung im obigen beobachteten Aktivitätsmuster zur Folge haben. Der beobachtete dramatische Abfall der Promotoraktivität mit anschließendem Wiederanstieg sollte ausbleiben. Vielmehr wurde erwartet, dass sich die Aktivität der einzelnen verkürzten Promotoren auf gleich bleibendem Niveau befindet. Dies ist jedoch nicht der Fall. *sac1*-Null-Zellen und *sac1*-*opi1*-Doppelnul-Zellen zeigten das gleiche Expressionsmuster (Abb. 24). Zusätzlich war zu beobachten, dass die entsprechenden Promotorkonstrukte im Doppel-Null-Hintergrund durchweg höhere transkriptionelle

Aktivität zeigten. Diese allgemein zu beobachtende Erhöhung der Aktivität des *SAC1*-Promotors muss also auf andere Weise reguliert werden.

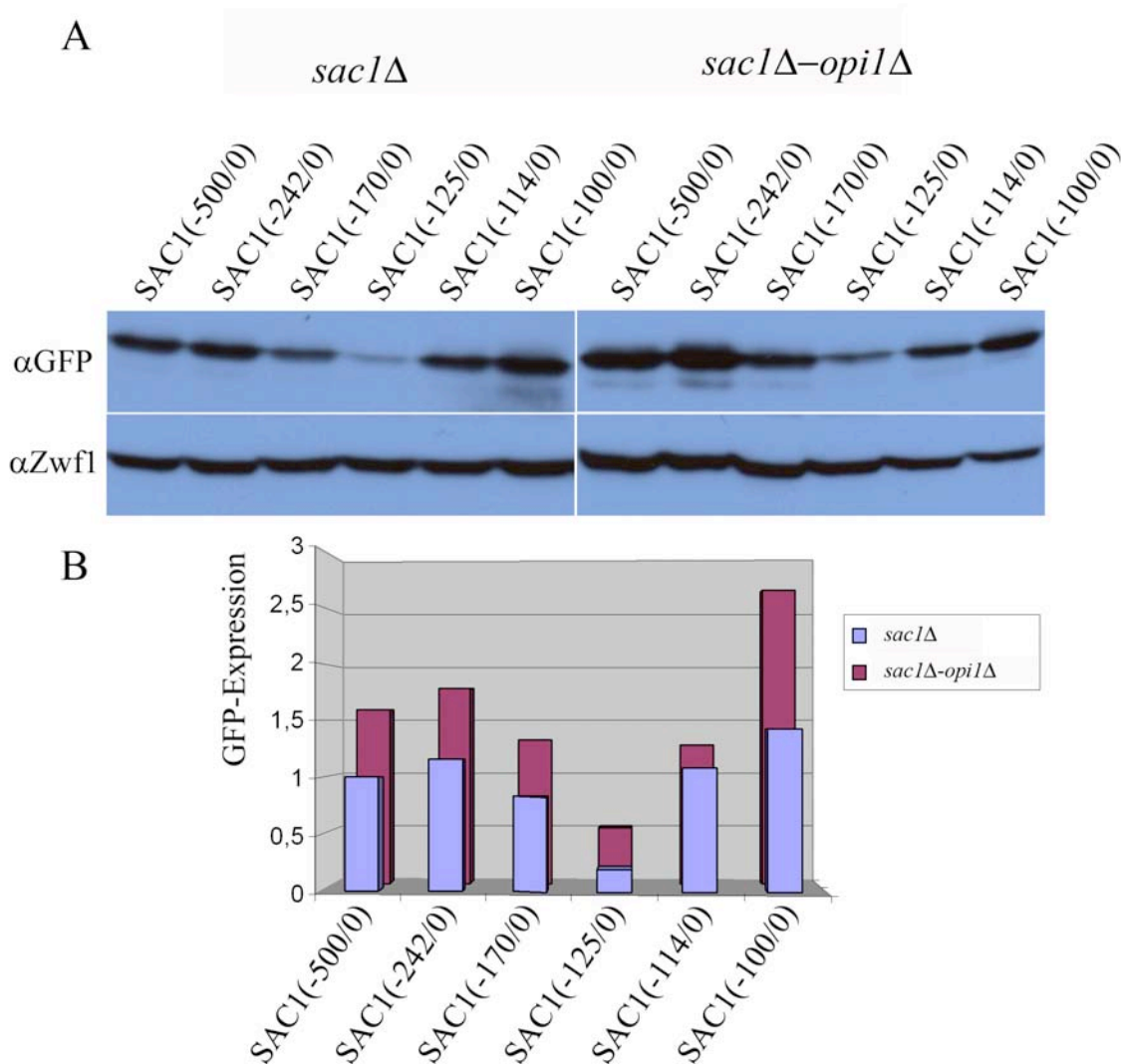


Abb. 24. A, Die angegebenen Promotorkonstrukte wurden in die jeweiligen Stämme eingebracht und ihre Aktivität mittels GFP-Detektion durch ein Antiserum ermittelt. Hierfür wurden Zellextrakte präpariert und die Proteine mit SDS-PAGE und Westernblot analysiert. B, Quantifizierung der GFP-Expression unter der Kontrolle der einzelnen Promotorkonstrukte als grafische Darstellung.

Es gibt in der Literatur viele Beispiele dafür, dass Enzyme durch ihre Substrate reguliert werden. Das *in vivo*-Substrat von Sac1p ist das Phospholipid PtdIns(4)P. Dies ist ein Signalmolekül an Membranen, welches von Sac1p in Phosphatidylinositol und Orthophosphat gespalten wird. Die intrazelluläre Menge von PtdIns(4)P ist in *sac1Δ*-Zellen bis zu zehnfach erhöht. Eventuell ist dies der Grund für die erhöhte Promotor-

aktivität in *sac1* Δ -Zellen. Um dies direkt zu testen, sollte die Aktivität des *SAC1*-Promotors in *sac1* Δ -Stämmen untersucht werden, in denen die Produktion von zellulärem PtdIns(4)P erniedrigt war. Hierfür wurden Stämme analysiert, die zusätzlich zur Deletion von *SAC1* verschiedene temperatursensitive Versionen von PtdIns(4)P-erzeugenden Lipidkinasen exprimierten.

2.2.4 Die *SAC1*-Expression ist von zellulärem PtdIns(4)P abhängig

Zelluläres PtdIns(4)P wird durch die enzymatische Aktivität verschiedener Phosphoinositid-4-Kinasen aus Phosphatidylinositol erzeugt. In Hefe wurden bisher drei Enzyme dieser Klasse identifiziert, Lsb6p, Stt4p und Pik1p. Stt4p und Pik1p sind für die Zelle essentiell, da die jeweilige Deletion dieser Gene zu einem letalen Phänotypen führt. Um zu testen, ob Veränderungen im Lipidhaushalt durch ein Fehlen dieser Enzyme Auswirkungen auf die *SAC1*-Expression hat, wurden temperatursensitive Versionen mit *sac1* Δ -Mutanten kombiniert und die transkriptionelle Aktivität des *SAC1*-Promotors untersucht. Hierfür wurden diese Stämme mit dem *SAC1*(-500/0)-GFP-Plasmid transformiert und die Expression von GFP bei semipermissiven Temperaturen (30°C) untersucht. Abbildung 25 zeigt die Expression von GFP unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors in den verschiedenen Stämmen. Es konnte beobachtet werden, dass durch die jeweilige Kombination von *stt4*^{ts} bzw *pik1*^{ts} mit der Deletion von *SAC1* die Aktivität des Promotors deutlich erniedrigt werden konnte. Die *stt4*^{ts}-Mutation zeigte dabei eine reproduzierbare stärkere Erniedrigung als *pik1*^{ts}. Die Absenkung der intrazellulären PtdIns(4)P-Werte durch die Inaktivierung der PtdIns(4)P-erzeugenden Kinasen hatte also direkten Einfluss auf die Aktivität des *SAC1*-Promotors.

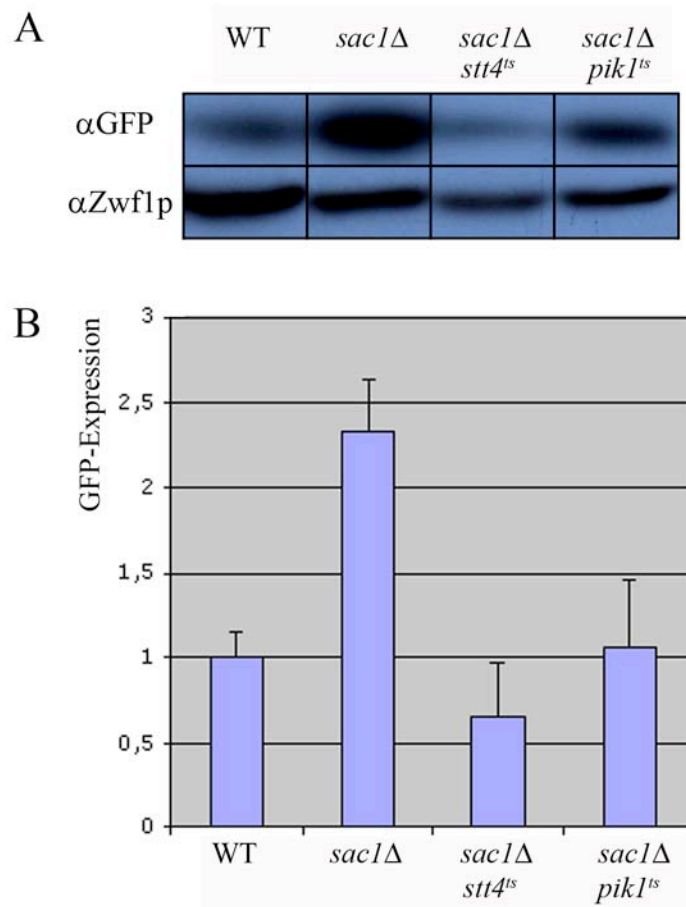


Abb 25. A, Die Aktivität des *SAC1*-Promotors wurde anhand der Expression von GFP in den angegebenen Stämmen untersucht. Hierfür wurden Zellextrakte präpariert und die Proteine mit Westernblot und einem Antiserum gegen GFP analysiert. B, Quantifizierung der GFP-Expression unter der Kontrolle des *SAC1*-Promotors als grafische Darstellung.

Um diesen Zusammenhang genauer zu testen, wurden die intrazellulären PtdIns(4)P-Mengen in den einzelnen Stämmen bestimmt. Hierfür wurden Zellen von allen Stämmen mit ³H-*myo*-Inositol markiert und die PtdIns(4)P-Werte mittels HPLC („high performance liquid chromatography“) gemessen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 26 grafisch zusammengefasst.

Es konnte bestätigt werden, dass *sac1*Δ-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp etwa zehnfach erhöhte Mengen an PtdIns(4)P aufweisen. Diese dramatische Erhöhung kann durch die Kombination der *sac1*Δ-Mutation sowohl mit *stt4*^{ts} als auch mit *pik1*^{ts} wieder abgeschwächt werden. Beide Doppelmutationen zeigen im Vergleich zu den *sac1*Δ-Zellen wieder deutlich niedrigere PtdIns(4)P-Mengen. Die beiden Lipidkinasen erzeugen Fraktionen von PtdIns(4)P an unterschiedlichen Stellen der Zelle. So produziert Pik1p

PtdIns(4)P an Membranen des Golgi-Apparates während Stt4p die PtdIns(4)P-Mengen an der Plasmamembran erzeugt. Stt4p scheint einen weit höheren Anteil an der Produktion von PtdIns(4)P-Mengen zu haben, die von Sac1p phosphoryliert werden können. So hatte die Kombination von *sac1* mit *stt4^{ts}* einen viel stärkeren Rückgang der zellulären PtdIns(4)P-Mengen zur Folge als die Kombination mit *pik1^{ts}* (Foti et al., 2001). Diese Beobachtung korreliert exakt mit den zuvor gemessenen Promotoraktivitäten. So war in einem *sac1* Δ *stt4^{ts}*-Stamm die Aktivität des *SAC1*-Promotors niedriger als in einem *sac1* Δ -*pik1^{ts}*-Stamm.

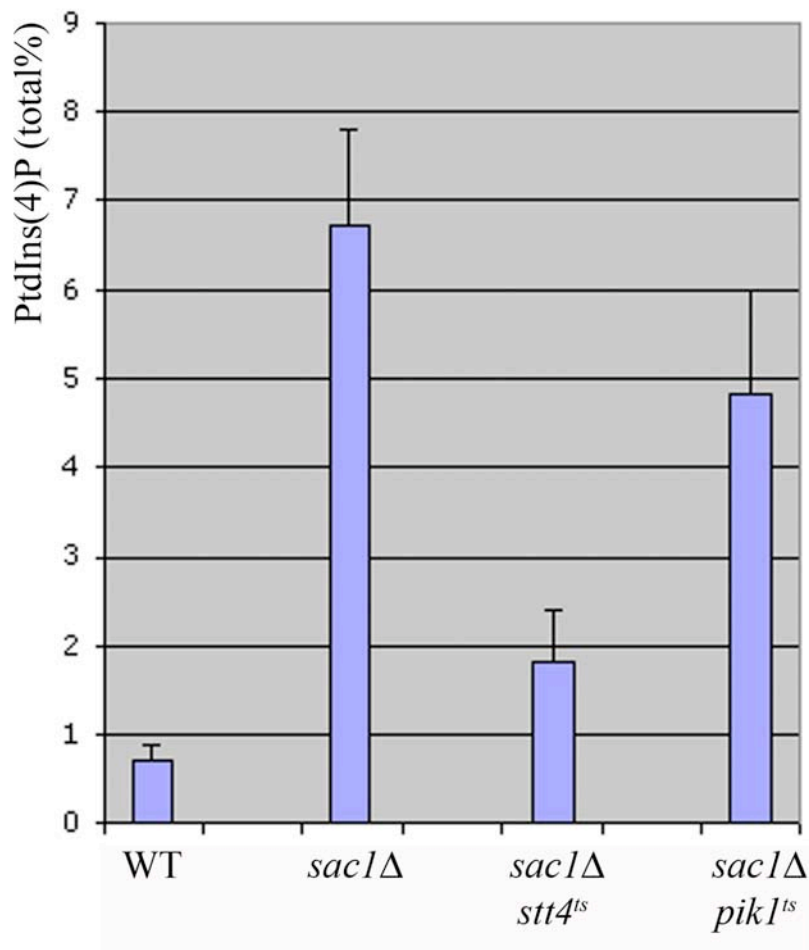


Abb. 26. Zellen der angegebenen Stämme wurden mit ^3H -*myo*-Inositol markiert, die Phospholipide präpariert und die PtdIns(4)P-Mengen mittels HPLC quantifiziert

Diese Daten deuten darauf hin, dass PtdIns(4)P ein wichtiger Regulator für die Aktivität des *SAC1*-Promotors darstellt. In Zellen mit erhöhten Mengen an PtdIns(4)P war die Aktivität des Promotors deutlich erhöht. Wurden diese Fraktionen von PtdIns(4)P durch

die Inaktivierung von PtdIns(4)P-erzeugenden Lipidkinasen wieder reduziert, so nahm auch die Aktivität des *SAC1*-Promotors ab, wobei die unterschiedlichen intrazellulären Mengen an PtdIns(4)P mit den Unterschieden in der Promotoraktivität korrelierte.

2.3 Analyse phosphoinositidbindender Proteine mit Hilfe von Liposomen

Wenn PtdIns(4)P selbst für die Regulation von *SAC1* verantwortlich ist, so muss das Signal zur Steuerung der Expression von intrazellulären Membranen in den Nukleus gelangen. Möglicherweise erfolgt diese Signalweitergabe über die Rekrutierung eines bisher unbekanntes Effektorproteins an PtdIns(4)P-reiche Membranen.

Um Proteine zu identifizieren, die direkt mit Phosphoinositiden interagieren können, habe ich eine Methode entwickelt, die Liposomen als Affinitätsmatrix verwendet. Die Liposomen waren aus 60 % Phosphatidylcholin, 20 % Phosphatidylinositol, 10 % Cholesterin und spezifischen Phosphoinositiden aufgebaut, wobei die eingesetzten Lipidkonzentrationen zellulären Membranen nachempfunden war. Zusätzlich enthielten die Liposomen zur späteren Affinitätsreinigung 10 % N-Biotinyl-Cap-Phosphatidylethanolamin, ein artifizielles, biotinyliertes Phospholipid (Abb. 27A). Nach Inkubation mit zellulären Fraktionen können an Liposomen gebundene Proteine durch Bindung an Straptavidinagarose aufgereinigt werden (Abb. 27B). Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Westernblot oder Coomassie-Färbung. Um diesen experimentellen Ansatz zu testen, wurden verschiedene bekannte lipidbindende Proben in Hefe exprimiert. Es wurden Proben spezifisch für die Phosphoinositide PtdIns(4)P, PtdIns(3)P und PtdIns(4,5)P₂ eingesetzt. Als PtdIns(4)P-spezifische Probe wurde die mit GFP fusionierte PH-Domäne des humanen Proteins FAPP1 verwendet (GFP-PH-FAPP1) (Stefan et al., 2002). Als Probe für PtdIns(3)P diente die mit GFP-fusionierte FYVE-Domäne des Proteins EEA1 (GFP-FYVE-EEA1) (Burd et al., 1998), und als spezifischer Interaktionspartner für PtdIns(4,5)P₂ wurde GFP-PH-PLC β 1 verwendet (Stefan et al., 2002) (Abb. 28). Jede dieser Proben wurde individuell in Wildtyphefzellen exprimiert, von welchen anschließend mikrosomale Membranen präpariert wurden. Durch Interaktion mit ihren spezifischen Phosphoinositidbindungspartnern waren die Phosphoinositidproben an diese Membranen

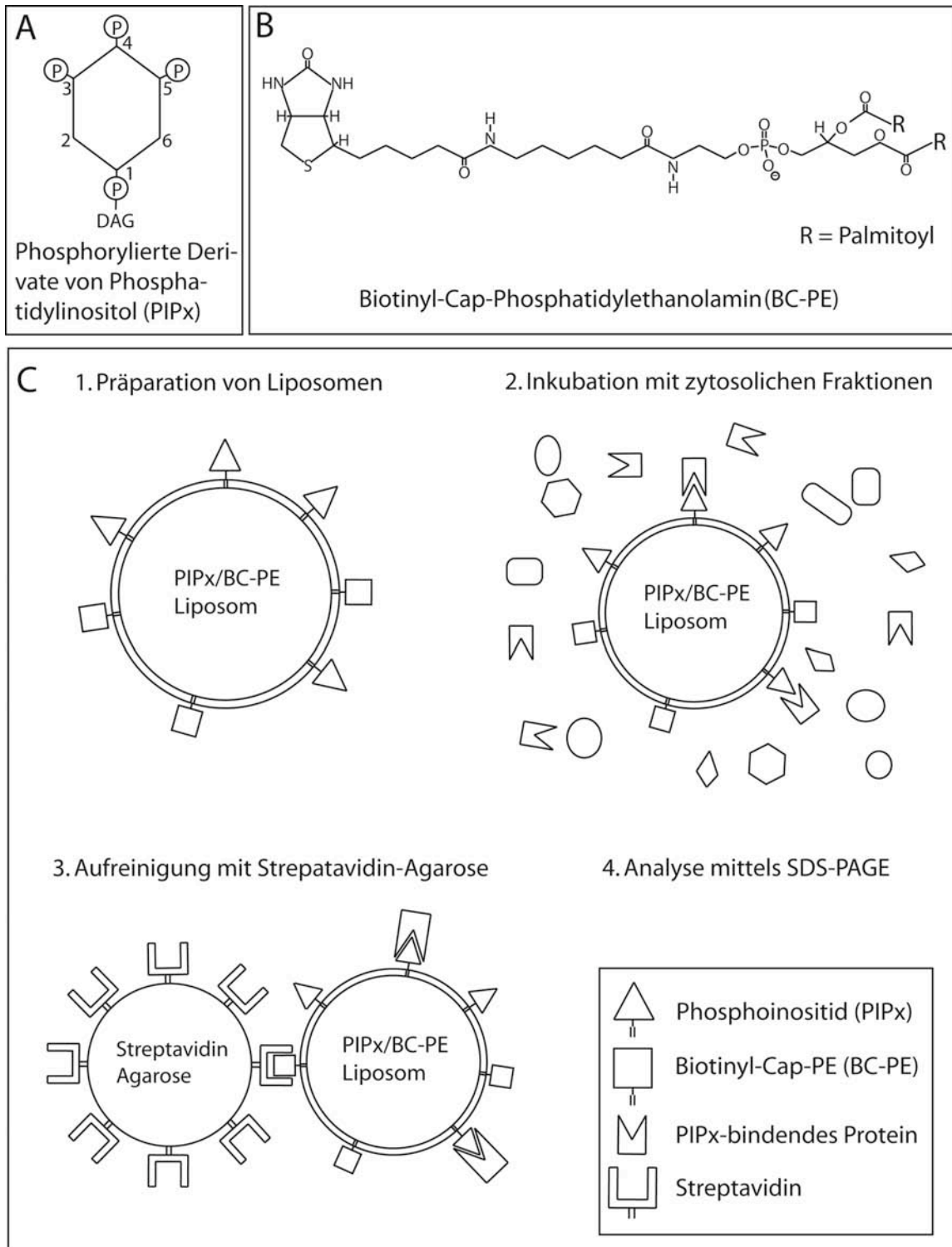


Abb. 27. A, Schematische Darstellung des Inositolrings von Phosphatidylinositol. Die Positionen 3, 4 und 5 können reversibel phosphoryliert werden. B, Struktur des N-Biotinyl-Cap-Phosphatidylethanolamins. Die Biotingruppe ist über einen Arm aus sechs Kohlenstoffen an die Ethanolaminkopfgruppe gebunden. C, Liposomen werden mit subzellulären Fraktionen inkubiert und gebundene Proteine anschließend mittels Interaktion der Biotingruppe mit immobilisiertem Streptavidin aufgereinigt.

gebunden. Durch Karbonatbehandlung wurden diese und andere periphere membrangebundene Proteine in Lösung gebracht und die Membranen durch Zentrifugation entfernt. Diese Proteinfraktionen wurden danach mit Liposomen inkubiert, die das für die Probe spezifische Phosphoinositid enthielten. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze mit Straptavidinagarosekügelchen inkubiert. Dabei interagierte die Biotingruppe des N-Biotinyl-Cap-Phosphatidylethanolamins mit Streptavidin. Durch Zentrifugation wurden die Agarosekügelchen und daran gebundene Protein-Liposomenkomplexe aus der Lösung entfernt und sowohl diese als auch die Überstände mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Bindung der einzelnen Proben an die

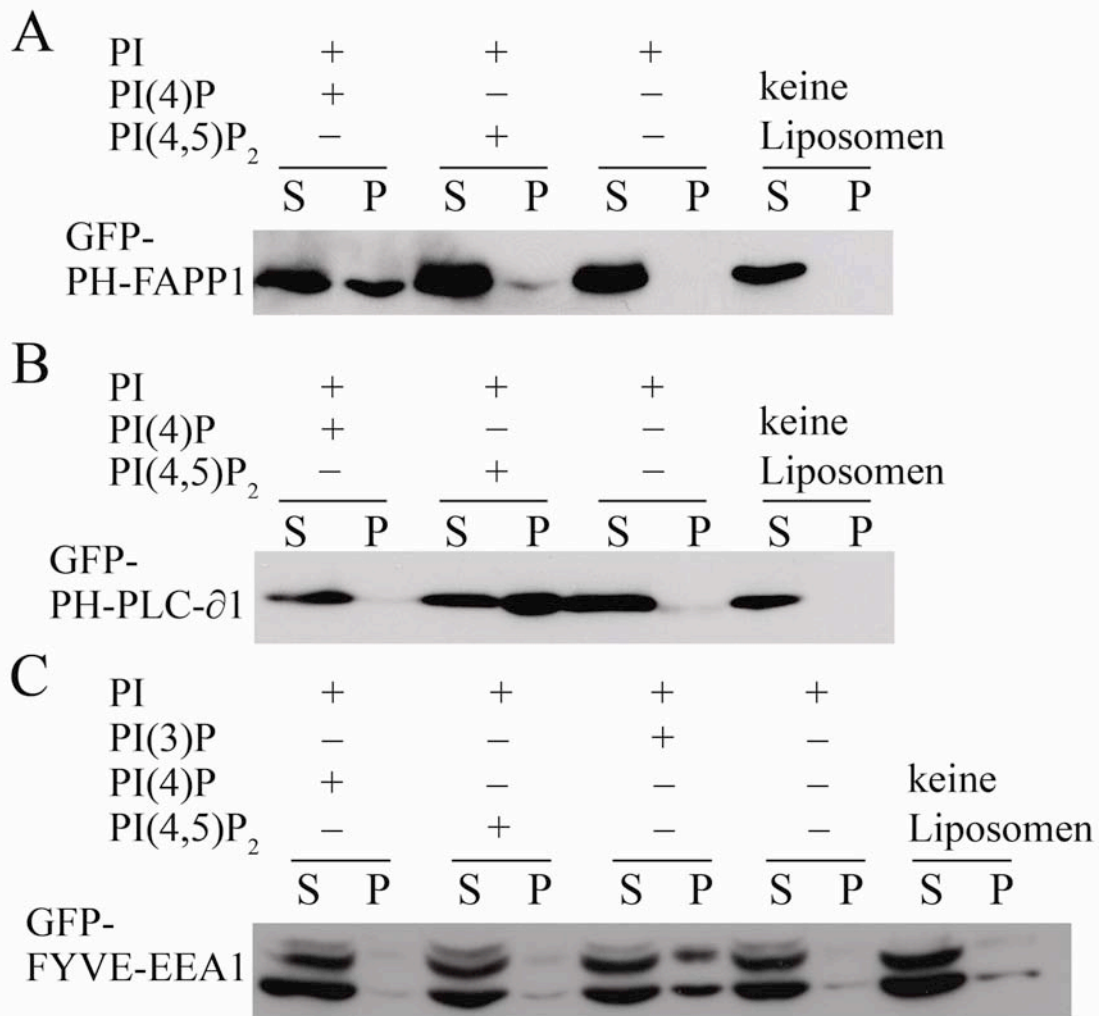


Abb. 28. Subzelluläre Fraktionen mit GFP-PH-FAPP1 (A), GFP-PH-PLC δ 1 (B) und GFP-FYVE-EEA1 (C) wurden mit Liposomen, die die angegebenen Phosphoinositide enthielten, inkubiert. Anschließend folgte die Affinitätsreinigung mit Streptavidinagarose und Westernblotanalyse mit einem Antiserum gegen GFP. P, Pellet, S, Supernatant.

entsprechenden Liposomen war sehr spezifisch. So band die PtdIns(4)P-spezifische Probe GFP-PH-FAPP1 sehr stark an Liposomen, die PtdIns(4)P enthielten. Mit anderen Phosphoinositiden konnte entweder eine sehr viel schwächere (PtdIns(4,5)P₂) oder gar keine Bindung beobachtet werden (PtdIns(3)P) (Abb. 28A). Vergleichbare Resultate wurden auch für die beiden anderen Proben erzielt. So zeigte GFP-PH-PLC η eine starke und exklusive Bindung an Liposomen, die den spezifischen *in vivo* Bindepartner PtdIns(4,5)P₂ enthielten (Abb. 28B). Das PtdIns(3)P-spezifische Fusionsprodukt GFP-FYVE-EEA1 zeigte wie erwartet eine große Affinität zu Liposomen mit PtdIns(3)P, wobei hier auch einige schwache Interaktionen mit den jeweils anderen Liposomen beobachtet werden konnten (Abb. 28C).

Die sehr hohe Spezifität dieses experimentellen Versuchsaufbaus ermöglicht es ganz gezielt Protein-Lipid-Interaktionen zu analysieren. Von großem Interesse war jedoch die Identifikation neuer PtdIns(4)P-bindender Faktoren. Hierzu wurde der Versuchsansatz aufskaliert und PtdIns(4)P-enthaltende Liposomen mit karbonatextrahierten Fraktionen von Hefemembranen inkubiert. An Liposomen gebundene Proteine wurden anschließend mit Streptavidinagarose aufgereinigt. Als Kontrolle dienten Liposomen ohne PtdIns(4)P. Nach Analyse mit SDS-PAGE wurden die Proteinbanden zur visuellen Analyse mit „Colloidal Coomassie Blue“ angefärbt (Abb. 29). Von Interesse waren hierbei Proteinbanden, die mit PtdIns(4)P-enthaltenden Liposomen, aber nicht mit den Kontrollliposomen, angereichert werden konnten. Eine Proteinbande konnte mit PtdIns(4)-enthaltenden Liposomen aufgereinigt werden und war nach Blaufärbung deutlich in der entsprechenden Spur des Gels sichtbar (Abb. 29). Diese Bande wurde ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie als Kes1p identifiziert. Kes1p gehört zur Familie der oxysterolbindenden Proteine (OSBP) in Hefe. Es wird vermutet, dass Kes1p über Interaktion mit PtdIns(4)P an die Golgimembran lokalisiert wird. Li und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation von Kes1p gestört war, wenn die PtdIns(4)P-erzeugenden Lipidkinasen Pik1p und Stt4p in ihrer Funktion beeinträchtigt waren (Li et al., 2002). Mit dem vorliegenden Ergebnis konnte ein erster direkter Nachweis erbracht werden, dass Kes1p tatsächlich mit PtdIns(4)P interagiert.

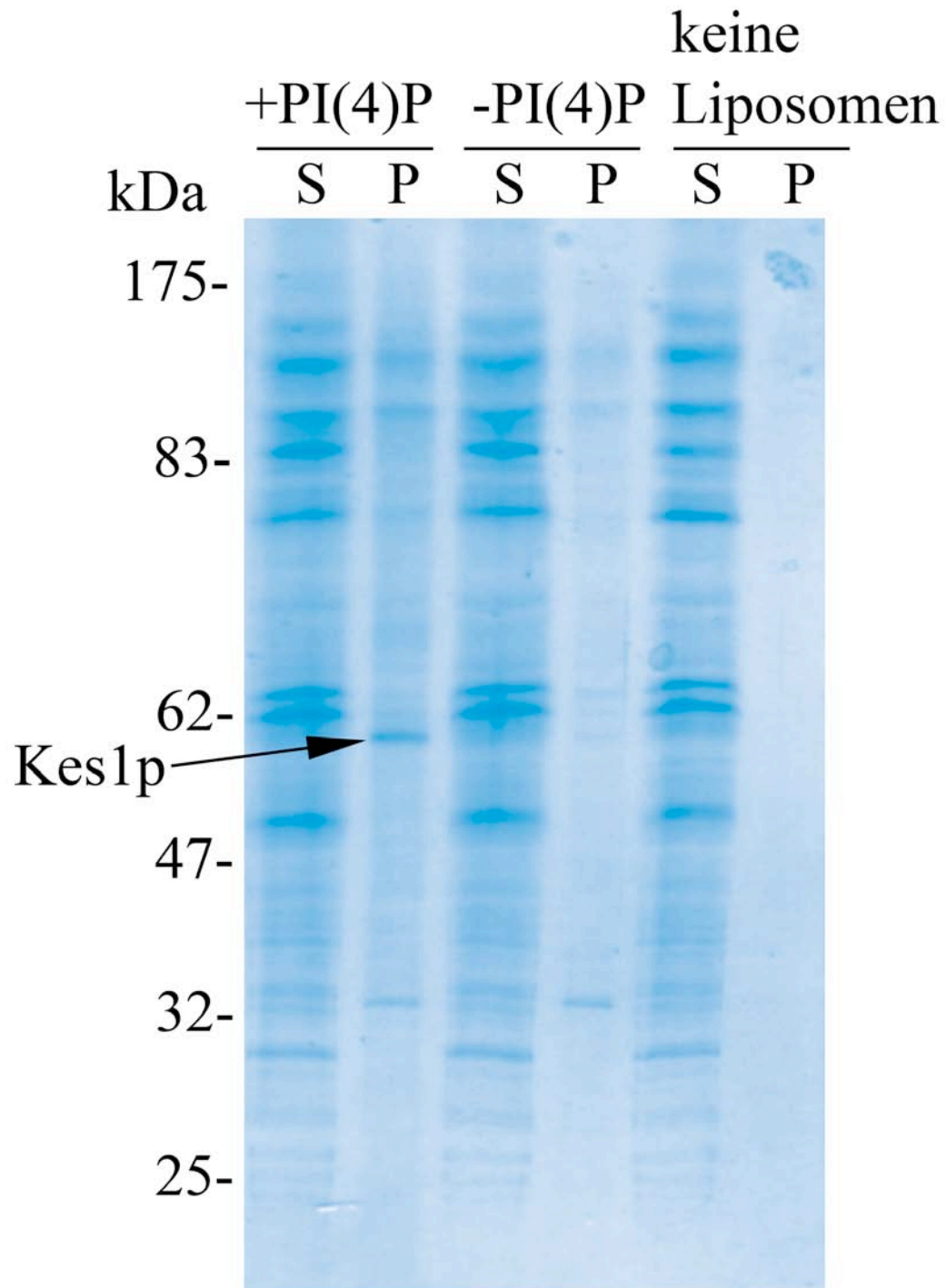


Abb. 29. Dialysierte Karbonatextrakte von mikrosomalen Hefemembranen wurden mit Liposomen inkubiert die PtdIns(4)P enthielten. Gebundene Proteine wurden mittels Interaktion mit Straptavidinagarose aufgereinigt und mit SDS-PAGE analysiert. Das Protein Kes1p konnte mit Massenspektrometrie als PtdIns(4)P-bindender Faktor identifiziert werden.

Es ist nicht gelungen, weitere bisher unbekannte PtdIns(4)P-bindende Proteine zu identifizieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass viele dieser Faktoren eine relativ niedrige Abundanz in der Zelle aufweisen und somit höhere Aufskalierungen des Versuchsaufbaus erforderlich sind. Jedoch wurde gezeigt, dass die entwickelte Methode sowohl zur Analyse von Protein-Lipidinteraktionen als auch zur Identifikation lipidbindender Proteine verwendet werden kann.

3 Diskussion

3.1 Charakterisierung der Promotorregion von *SAC1*

Die Lipidphosphatase Sac1p in Hefe ist über die Kontrolle lokaler PtdIns(4)P-Mengen an der Regulation vieler wichtiger zellulärer Mechanismen beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Regulation des ATP-Transports, der Sekretion von Proteinen und die effektive Proteinglykosylierung im ER. Die Vielfalt dieser Funktionen erfordert, dass auch die Expression von *SAC1* selbst einer sehr genauen Regulation unterworfen ist. Allerdings ist bisher wenig über diese Regulation bekannt. Eine Strategie zur Analyse der transkriptionellen Regulation von *SAC1* bestand darin, die Promotorregion von *SAC1* zu untersuchen und zu charakterisieren. Promotoren in Eukaryonten sind aus dem basalen und proximalen Promotor aufgebaut. Der basale Promotor besteht aus DNA-Sequenzmotiven, die innerhalb der Nukleotide -40 bis +40 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert sind. Hier befinden sich für die Initiation essentielle Motive wie TATA-Box und die TFIIB-Erkennungssequenz (Blackwood and Kadonaga, 1998). Der proximale Promotor umfasst die angrenzenden Regionen stromaufwärts, typischerweise zwischen -250 und -50 Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Blackwood and Kadonaga, 1998; Butler and Kadonaga, 2002). Hier finden sich weitere regulatorische Elemente wie die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, CTF und CBF (Blackwood and Kadonaga, 1998). Zusätzlich hierzu können regulierende *cis*-Elemente über Tausende von Basenpaaren zum Transkriptionsstart entfernt existieren (Butler and Kadonaga, 2002). So liegt die „enhancer“-Sequenz für das murine Gen der α -Kette des T-Zellrezeptors 69 kb stromabwärts des Promotors (Blackwood and Kadonaga, 1998). In Hefe sind in der Regel alle regulierenden Elemente innerhalb der ersten 500 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert (Struhl, 1989; Struhl, 1995). Für die vorliegende Arbeit wurde deswegen die Region -500 bis -1 stromaufwärts des *SAC1*-Leserasters als *SAC1*-Promotor bezeichnet. Die TATA-Box in Hefegenen befindet sich im Allgemeinen zwischen den Nukleotiden -40 und -120 stromaufwärts (Struhl, 1989), im *SAC1*-Promotor wurde eine Sequenz TATAA innerhalb der Region -50 bis -46 lokalisiert (Konsensussequenz: TATAAA). Um die Aktivität des *SAC1*-Promotors besser studieren zu können, wurde die Promotorregion zunächst mit

Reportergenem fusioniert. Mit Hilfe dieser Konstrukte konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *SACI*-Promotors in *sacID*-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen zweifach erhöht war.

Im Folgenden wurden verschiedene verkürzte Varianten des *SACI*-Promotors mit Reportergenem fusioniert und die Promotoraktivität analysiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Entfernung einer Region, die den basalen Promotor mit TATA-Box und angrenzenden regulatorischen Elementen enthält, zur Inaktivierung des Promotors führt. Dieses Resultat entsprach den Erwartungen, obwohl intensive Promotoranalysen der letzten Jahre gezeigt haben, dass im Gegensatz zu früheren Annahmen bei weitem nicht alle Promotoren auf eine TATA-Box angewiesen sind. So sind in humanen Genen nur 32% aller Gene mit einer TATA-Box ausgestattet (Suzuki et al., 2001). Jedoch wird bei diesen Genen die Transkription durch Bindung essentieller Transkriptionsfaktoren wie TFIID an eine stromabwärts gelegene Sequenz eingeleitet (DPE = „downstream core promoter element“) (Burke and Kadonaga, 1996). Wird in Genen, die über eine TATA-Box verfügen, diese durch Mutationen verändert, so hat dies eine Reduktion oder die gänzliche Inaktivierung der Promotoraktivität zur Folge (Grosschedl and Birnstiel, 1980). Dies steht im Einklang mit den beobachteten Resultaten. Eine Deletion der stromaufwärts gelegenen Basenpaare –500 bis –318 zeigte dagegen keine nennenswerte Auswirkung auf die *SACI*-Promotoraktivität. Die Vermutung liegt also nahe, dass alle für den Transkriptionsstart essentiellen und regulatorischen Elemente innerhalb der Region –317 bis –1 liegen.

Zur weiteren Charakterisierung wurde diese Region sukzessive zum Transkriptionsstartpunkt hin verkürzt und zur Analyse mit GFP fusioniert. Es konnte gezeigt werden, dass der minimale Promotorbereich, der noch transkriptionelle Aktivität zeigt, die Region –100 bis –1 umfasst. Eine weitere Verkürzung um zusätzliche siebzehn Basenpaare führte zur Inaktivierung der Promotoraktivität. Der proximale Promotor, der zusätzliche regulatorische Bindestellen für zell- und gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren enthält, erstreckt sich in der Regel über bis zu 200 Basenpaare stromaufwärts, angrenzend zum basalen Promotor. Die Region des basalen Promotors ist dabei sehr distinkt und konzentriert sich um die TATA-Box (Blackwood and Kadonaga, 1998). Da die TATA-Box des *SACI*-Promotors relativ nahe zum Startpunkt des offenen Leserasters lokalisiert

ist - in Hefe kann die Position der TATA-Box ganz im Gegensatz zu humanen Genen sehr variabel lokalisiert sein (Struhl, 1995) - wurde angenommen, dass sich in diesem als essentiell herausgestellten Bereich von -100 bis -84 bereits Elemente des proximalen Promotors und somit potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren befanden. Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass der 100 Basenpaare umfassende Minimalpromotor einer ähnlichen Regulation wie der Gesamtpromotor unterlag. So war die Promotoraktivität dieses verkürzten Promotors in *sac1D*-Zellen ebenfalls deutlich stärker als in Wildtypzellen. Somit scheinen die für eine derartige Regulation notwendigen Elemente auch innerhalb des minimalen Promotors präsent zu sein.

Ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein eines regulatorischen Elements innerhalb der siebzehn Basenpaare zwischen -100 und -84 konnte gefunden werden, als diese Region innerhalb des Gesamtpromotors deletiert wurde. Der resultierende Promotor *SAC1_{500D}(-100/-84)* zeigte keine transkriptionelle Aktivität, wohingegen eine angrenzende Deletion der Basenpaare -83 bis -70 keine Auswirkung auf die Aktivität hatte. Durch zusätzliche Deletionskonstrukte konnte die für eine effektive Transkription essentielle Region auf die Basenpaare -100 bis -92 eingegrenzt werden. Die Basenabfolge innerhalb dieses Bereiches ist ACCACAGGT. Bei genauerer Betrachtung konnte diese Sequenz als palindromartige Struktur identifiziert werden. Die Basenabfolge ACCGGT ist palindromisch aufgebaut, wird allerdings von den Basenpaaren ACA unterbrochen. Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren haben nicht notwendigerweise palindromartigen Charakter, jedoch sind einige Beispiele in der Literatur bekannt. So bindet der Transkriptionsfaktor NRF-1, der für die Regulation mitochondrialer Gene im Nukleus verantwortlich ist, an das 8-mer Palindrom CGCATGCG (Scarpulla, 2002). Ein weiteres, mit großer Häufigkeit vorkommendes 8-mer Palindrom ist TCACGTGA, an das Mitglieder der USF-Proteinfamilie binden können, DNA-bindende Proteine mit einem basischen Helix-Loop-Helix-Zipper-Motiv (Boyd and Farnham, 1999). Fitzgerald et al. deuten sogar an, dass Palindrome die dominante Struktur in Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren sein könnten. Grund hierfür sei die Tatsache, dass beide Stränge der DNA von Transkriptionsfaktoren erkannt werden können und dass Palindrome von dimerischen Proteinen gebunden werden (FitzGerald et al., 2004). Untersuchungen zur DNA-Proteininteraktion mit

„bandshift“ Experimenten konnten zeigen, dass innerhalb der essentiellen Region die palindromischen Basenpaare von besonderer Bedeutung waren. Wurden Oligonukleotide mit der intakten Basenabfolge ACCACAGGT für Protein-DNA-Interaktionstests eingesetzt, so konnten 2 Banden identifiziert werden, die an diese Oligonukleotide gebunden waren. Wurden die palindromischen Basenpaare jedoch mutiert, so reduzierte sich die Interaktion mit den beiden Proteinen dramatisch. Auch die Mutation der drei Basenpaare in der Mitte der Basenabfolge hatte eine schwächere Wechselwirkung zur Folge, jedoch war diese weniger stark reduziert. Vermutlich handelte es sich bei dem höher laufenden zweiten Protein um einen multimeren Komplex des kleineren Proteins, da beide Banden auf Mutationen in der Basenabfolge der Oligonukleotide in gleicher Weise reagierten.

Im anschließenden Versuch zur Aufreinigung dieser beiden Proteinfaktoren wurden Oligonukleotide, die die spezifische Basenabfolge enthielten, kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden und mit Proteinfractionen inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Proteine an die an Sepharose gekoppelten Oligonukleotide spezifisch war. Wurden freie, nicht an Sepharose gekoppelte, spezifische Oligonukleotide als Kompetitor in den Reaktionsansatz zugegeben, so verblieb die Bindeaktivität in der Lösung. Waren freie Oligonukleotide mit weit niedrigerer Spezifität anwesend, so banden die Proteine über die gekoppelten Oligonukleotide an Sepharose und waren nicht mehr im Überstand enthalten. Dieser Ansatz wurde aufskaliert um genügend Mengen an Protein zu reinigen, so dass eine Detektion im SDS-Gel nach Anfärben möglich war. Zwei Banden konnten dabei identifiziert werden, die spezifisch an Sepharose banden. Mit massenspektrometrischen Analysen konnten die Proteine als „DNA-directed RNA Polymerase III“ und „replication factor A“ identifiziert werden. Die RNA-Polymerase III ist für die Herstellung von ribosomalen RNAs und tRNAs zuständig und somit nicht für die Expression von Genen von Interesse. Möglicherweise war dieses Enzym unspezifisch an die Oligonukleotide gebunden. Die Identifikation des replication factor A war deswegen überraschend, da dieser *in vivo* an einzelsträngige DNA bindet. Er ist wichtig für die DNA-Replikation, die DNA-Reparatur und die Rekombination (Alani et al., 1992; Longhese et al., 1994). Durch dessen Bindung an einzelsträngige DNA wird diese vor Nukleasen geschützt und die Ausbildung von Haarnadelstrukturen verhindert. Eine

weitere Funktion ist die Rekrutierung und Assemblierung bestimmter DNA-prozessierender Proteine und deren funktionelle Koordination (Kowalczykowski, 2000; Yuzhakov et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass der „replication factor A“ mit einer ganzen Reihe von Proteinen interagieren kann (Fanning et al., 2006), unter anderem auch mit dem chromatinreorganisierenden Faktor FACT (VanDemark et al., 2006). FACT spielt unter anderem eine Rolle bei der Regulation der Transkription. So unterstützt das Hefehomolog yFACT die Initiation der Transkription durch Verstärkung der Wechselwirkung des TATA-Box-bindenden Proteins TBP und des Transkriptionsfaktors TFIIA mit der TATA-Box in nukleosomaler DNA. (VanDemark et al., 2006). Die Frage, ob yFACT an der Regulation von *SACI* beteiligt ist, lässt sich jedoch nicht beantworten. Der replication factor A konnte möglicherweise deswegen gefunden werden, da er über spezifische oder auch unspezifische Interaktionen mit anderen Proteinen an die Sepharose gebunden war. Dies würde eine Erklärung dafür liefern, weshalb ein einzelstrangbindendes Protein durch doppelsträngige Oligonukleotide aufgereinigt werden konnte.

3.2 Untersuchungen zur funktionellen Regulation der *SACI*-Expression

3.2.1 Der *SACI*-Promotor ist UPR-unabhängig aber inositol sensitiv

Als zweiter Ansatz zur Untersuchung der *SACI*-Expressionsregulation wurden die Einflüsse von äußeren Parametern auf die Aktivität des Promotors untersucht. Es war bekannt, dass in *sac1D*-Stämmen die „unfolded protein response“ (UPR) aktiviert ist (Kochendorfer et al., 1999). Grund hierfür ist die erniedrigte ATP-Aufnahme in das ER-Lumen in *sac1D*-Mutanten, welches für eine korrekte Faltung durch die Proteinfaltungshelfer benötigt wird. Die UPR setzt dabei eine Signalkaskade in Gang, die die Transkription einer Reihe von stressreduzierenden Proteinen auslöst. Da auch die Aktivität des *SACI*-Promotors in *sac1*-Null-Zellen deutlich erhöht war, wurde in Wildtypzellen die UPR durch Zugabe von DTT in das Medium induziert. Es konnte jedoch keine Erhöhung der Promotoraktivität beobachtet werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass der *SACI*-Promotor nicht unter der Kontrolle von UPR-aktivierten Transkriptionsfaktoren steht.

Ein weiterer bekannter Phänotyp von *sacI*-Nullmutanten ist die Inositolauxotrophie (Whitters et al., 1993). Zellen, denen das *SACI*-Gen fehlt, können nicht auf inositolfreiem Medium wachsen. Dem liegt jedoch kein Defekt in der Inositol- oder der Phosphatidylinositolbiosynthese zu Grunde. Whitters et al. haben gezeigt, dass die Synthese beider Moleküle in *sacID*-Mutanten funktional ist. (Whitters et al., 1993). Es muss also eine andere Verbindung zwischen der Funktion von Sac1p und dem Lipidstoffwechsel existieren. Wurden Wildtypzellen in inositolfreiem Medium kultiviert, so konnte beobachtet werden, dass die Aktivität des *SACI*-Promotors deutlich zunahm. Die Zugabe von siebenfach erhöhten Mengen an Inositol in das Wachstumsmedium hatte den gegenteiligen Effekt zur Folge, die Aktivität des *SACI*-Promotors war reduziert. Whitters et al. haben ebenfalls gezeigt, dass die Inositolkonzentrationen in *sacID*-Mutanten in inositolhaltigem Medium im Vergleich zu Wildtypzellen leicht erniedrigt waren. Es ist jedoch unklar, ob dies alleine für die Erhöhung der Promotoraktivität ausreichend ist. Jedoch kann geschlussfolgert werden, dass es eine Verbindung zwischen Sac1p und der Lipidbiosynthese geben muss. Sowohl die Inositolauxotrophie als auch die erhöhte Aktivität des Promotors unter inositolfreien Bedingungen sind Indizien hierfür.

3.3.2 Genetische Interaktion zwischen *SACI* und *OPII*

Opi1p, ein wichtiger Repressor in der Lipidbiosynthese, ist für die negative Kontrolle vieler daran beteiligter Strukturgene notwendig. Entdeckt wurde Opi1p im Zusammenhang eines Phänotypen mit erhöhten Mengen an Inositol. Inzwischen ist bekannt, dass Opi1p indirekt mit den Promotorelementen der Gene interagiert, die für die Synthese von Phospholipiden verantwortlich sind. Wird *OPII* aus dem Genom deletiert, so können diese Gene nicht mehr negativ reguliert werden, was eine Überproduktion an Inositol nach sich zieht. Von großem Interesse war die Frage, ob die Deletion von *OPII* ebenso einen negativen Effekt auf die *SACI*-Promotoraktivität ausübt wie die Zugabe von Inositol in das Wachstumsmedium. Es konnte gezeigt werden, dass eine Doppeldeletion von *SACI* und *OPII* auf inositolfreiem Medium lebensfähig war. Die Überproduktion von Inositol durch die Deletion von *OPII* war genügend, um die Inositolauxotrophie einer *sacI*-Deletion zu komplementieren. Dies ist auch gleichzeitig ein Hinweis dafür, dass in *sacID*-Zellen die Lipidbiosynthese nicht defekt ist.

Anschließend wurde die Aktivität des *SACI*-Promotors in *OP11*-Mutanten direkt untersucht. Es war zu beobachten, dass die Deletion des *OP11*-Gens in Wildtypzellen keinen Einfluss auf die Aktivität des *SACI*-Promotors hatte. Die Aktivität des Promotors war mit der in Wildtypzellen identisch. Dies steht zunächst im Widerspruch mit dem zuvor durch Zugabe von siebenfach erhöhten Mengen an Inositol beobachteten Effekt. Eventuell hat jedoch die Überexpression von Inositol in *opi1D*-Stämmen weniger erhöhte Inositolkonzentrationen zur Folge als der zuvor getestete Überschuss. Wurde das *OP11*-Gen zusätzlich zum *SACI*-Gen deletiert, so hatte dies allerdings dramatische Auswirkungen auf die Promotoraktivität. Anstelle der erwarteten Reduktion der Promotoraktivität war diese in Zellen mit der *opi1-sac1*-Doppeldelation noch weiter erhöht. Die Entfernung des Repressors *Opi1p* führte also zu einer Erhöhung der Promotoraktivität, allerdings nur wenn zusätzlich *SACI* ebenfalls deletiert war. Die Vermutung, dass *Opi1p* die Aktivität des *SACI*-Promotors reprimiert, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Schon zuvor war beobachtet worden, dass die verschiedenen verkürzten Promotordelationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Promotoraktivität hatten. So war die um 258 Basenpaare verkürzte Promotorvariante *SACI*(-242/0) deutlich stärker aktiv als die Gesamtpromotorregion. Zusätzlich war ein dramatischer Abfall der Aktivität mit anschließendem Wiederanstieg zu beobachten, je mehr Basenpaare am 5'terminalen Bereich entfernt wurden. Eine Erklärung hierfür könnten Bindestellen für aktivierende und hemmende Faktoren liefern. Es gibt Beispiele in der Literatur, die gezeigt haben, dass hemmende Regionen stromaufwärts von Promotoren existieren, die bei Bindung des Repressors an die DNA selbst einen intakten Promotor inhibieren können (Struhl et al., 1985; Johnson et al., 1985). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass *Opi1p* nicht für das beobachtete Expressionsmuster verantwortlich ist. Wurden die Aktivitäten der verschiedenen Promotorkonstrukte in *sac1D-opi1D*-Doppelmutanten analysiert, so wurde das gleiche Expressionsmuster beobachtet. Die Deletion eines Repressors hätte eine Änderung des beobachteten Expressionsmusters zur Folge. Somit interagiert *Opi1p* nicht mit dem *SACI*-Promotor. Dies war nicht überraschend, da der Promotor von *SACI* kein UAS_{INO} -Element beinhaltet, das für die indirekte Interaktion mit dem Repressor *Opi1p* notwendig ist. Jedoch konnte bestätigt werden, dass die Deletion von *OP11* eine generelle Erhöhung der Promotoraktivität zur Folge hat. *Opi1p*

muss also auf indirekte Weise Einfluss auf die Aktivität des *SAC1*-Promotors nehmen. Da die Deletion von *OPI1* alleine nicht ausreicht, um diesen Effekt zu verursachen, müssen noch andere Faktoren dabei eine Rolle spielen.

3.3.3 PtdIns(4)P ist an der Regulation von *SAC1* beteiligt

In biologischen Stoffwechselfvorgängen werden die beteiligten Enzyme sehr oft von ihrem Substrat direkt reguliert. Das Substrat von Sac1p *in vivo* ist das Lipid PtdIns(4)P. Es ist bekannt, dass *sac1D*-Zellen bis zu zehnfach erhöhte Mengen an PtdIns(4)P aufweisen. Möglicherweise korreliert die erhöhte Aktivität des Promotors mit den erhöhten intrazellulären Mengen von PtdIns(4)P. Ein Hinweis hierfür lieferte die Beobachtung, dass die *SAC1*-Expression auch in Zellen mit einer *sac1*-Mutante mit eingeschränkter Phosphataseaktivität erhöht war. Diese Zellen zeigten dreifach erhöhte Mengen an PtdIns(4)P (Konrad et al., 2002). Eventuell nehmen die zellulären PtdIns(4)P-Mengen selbst direkten Einfluss auf die Expression von *SAC1*. Dies wurde getestet, indem die Aktivität des *SAC1*-Promotors in *sac1D*-Stämmen in Kombination mit mutierten Versionen der Lipidkinasen Pik1p bzw. Stt4p untersucht wurden. Pik1p und Stt4p erzeugen lokale PtdIns(4)P-Signale, die von Sac1p wieder terminiert werden können. Pik1p lokalisiert zu Membranen des Golgi-Apparates und ist dort für die Erzeugung von PtdIns(4)P-Signalen essentiell. Stt4p kontrolliert PtdIns(4)P-Fractionen an der Plasmamembran. Obwohl die Lokalisation von Stt4p nicht mit der von Sac1p übereinstimmt, scheint dennoch Stt4p die lokale PtdIns(4)P-Fraktion zu erzeugen, die hauptsächlich von Sac1p reguliert wird. (Foti et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Doppelmutanten die intrazellulären PtdIns(4)P-Mengen im Vergleich zu *sac1D*-Zellen reduziert waren. Dabei war der Rückgang der PtdIns(4)P-Mengen in Stämmen mit *sac1D* und *stt4^{ts}*-Mutation stärker als in *sac1D*-Zellen, die *pik1^{ts}* exprimierten (Foti et al., 2001). Auffallend war die Korrelation der intrazellulären PtdIns(4)P-Mengen mit der Promotoraktivität. So wurde beobachtet, dass die Aktivität des *SAC1*-Promotors sowohl in Zellen mit *sac1D* und *pik1^{ts}*-Mutationen als auch in Zellen mit *sac1D* und *stt4^{ts}*-Mutationen im Vergleich zur *sac1D*-Zellen deutlich reduziert war. Dabei hatte die Kombination von *sac1D* mit *stt4^{ts}* eine stärkere Reduktion der Aktivität zur Folge als die Kombination von *sac1D* mit *pik1^{ts}*. Dieses Muster stimmt

genau mit der Aktivität des *SAC1*-Promotors in diesen Stämmen überein. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *SAC1* einer Regulation unterworfen ist, an der zelluläre Mengen an PtdIns(4)P beteiligt sind. Die Expression des *SAC1*-Gens ist somit sowohl an den Lipidstoffwechsel als auch an PtdIns(4)P gekoppelt. Die Deletion von *OPI1* scheint zusammen mit PtdIns(4)P ein Signal zu erzeugen, dass die Regulation der *SAC1*-Expression beeinflusst. Jedoch ist dieser Mechanismus noch nicht verstanden. Da die Zugabe von Inositol eine Erniedrigung der Promotoraktivität zur Folge hatte, ist es unwahrscheinlich, dass Inositol das Signalmolekül darstellt. Möglicherweise spielen neben PtdIns(4)P noch andere Lipide eine Rolle, an deren Regulation *Opi1p* ebenfalls beteiligt ist.

3.3 Affinitätsreinigung phosphoinositidbindender Proteine mit Hilfe einer Liposomenmatrix

Wenn PtdIns(4)P ein direktes Signal für die Regulation der *SAC1*-Expression darstellt, dann muss dieses Signal von intrazellulären Membranen in den Nukleus übertragen werden. Dies könnte über die Rekrutierung eines PtdIns(4)P-bindenden Faktors an PtdIns(4)P-reiche Membranen geschehen. Die Bindung an PtdIns(4)P müsste dabei sehr spezifisch und selektiv erfolgen. Um solche phosphoinositidbindenden Proteine zu identifizieren, wurde eine Methode entwickelt, die Liposomen als Affinitätsmatrix verwendet. Die Liposomen bestanden aus Phospholipiden, wobei die eingesetzten Lipidkonzentrationen zellulären Membranen nachempfunden waren. Zusätzlich beinhalteten die Liposomen spezifische Phosphoinositide und zur späteren Affinitätsreinigung ein artifizielles, biotinyliertes Phospholipid. Mit diesem experimentellen Versuchsaufbau konnte die Bindung von spezifischen phosphoinositidbindenden Proteinen an Liposomen, die das entsprechende Phosphoinositid enthielten, nachgewiesen werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Methode geeignet ist, aus zellulären Fraktionen phosphoinositidbindende Proteine in für eine Identifikation ausreichender Menge aufzureinigen. In der Literatur sind einige andere Methoden charakterisiert worden, mit deren Hilfe Protein-Lipid-Interaktionen untersucht werden können. Der Unterschied zu bisher publizierten Analysemethoden mittels Liposomen (Macia et al., 2000; Patki et al., 1998; Schiavo et al., 1996) besteht darin, dass

subzelluläre Fraktionen verwendet werden können und somit die Identifikation neuer Binfaktoren ermöglicht wird. Bisher wurden sowohl auf Nitrozellulosestreifen immobilisierte Lipide (Saxena et al., 2002) als auch kovalent an Sepharose gebundene Phosphoinositide (Krugmann et al., 2002; Rao et al., 1999) für die Identifizierung neuer phosphoinositidbindender Proteine verwendet. Allerdings sind für diese Methoden intensive chemische Synthesen notwendig, um Phosphoinositide zu erhalten, die kovalent an einer festen Matrix immobilisiert werden können. Ebenfalls nachteilig wirken sich die Bindungen unspezifischer Proteine an die Matrix aus. Ein auf Liposomen basierendes System ist auch deshalb besser geeignet, weil die natürliche *in vivo* Umgebung der Protein-Lipid-Interaktionen besser simuliert wird. Dies ist deshalb wichtig, da die spezifische Bindung von Lipidbindedomänen nicht durch die Domäne alleine sondern auch durch zusätzliche Kofaktoren erreicht wird (Godi et al., 2004; Yu et al., 2004), die in einem *in vitro* Versuchsaufbau nicht vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass biotinylierte Liposomen für die Charakterisierung lipidbindender Proteine verwendet werden können. Durch die Variabilität in ihrer Lipidzusammensetzung können die Liposomen zur Untersuchung von Lipidbindeigenschaften bekannter lipidbindender Proteine eingesetzt werden. Aber auch die Identifikation bisher unbekannter lipidbindender Proteine wird hierdurch ermöglicht.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Heidelberg:

Als Zentrifugen wurden Sorval RC5B und RC5C, Heraeus Biofuge pico und Megafuge 1,0 R sowie Eppendorf Centrifuge 5417R eingesetzt. Als Mikroskop diente ein Diavert-Mikroskop von Leitz und ein BX60 Fluoreszenz-Mikroskop von Olympus mit einem Zeiss UPlanAPO 100x Ölimmersionsobjektiv. Die Bilder wurden mit einer Hamamatsu C4742-95 CCD Kamera und dem Programm „Openlab“ von Improvision (Heidelberg, Deutschland) aufgenommen. Als Spektrophotometer wurde das Ultraspec 3000 sowie das Novaspec II von Pharmacia Biotech verwendet. Zum Aufschluss von Hefezellen wurde ein Potter-Homogenisator (S) von B. Braun Laborgeräte eingesetzt. Die Detektion von ^{14}C -Signalen erfolgte mittels des Szintillationszählers LS60000IC von Beckman. Bakterien wurden mit dem Gene Pulser und Pulse Controller von BioRad transformiert, die benutzte speed vac war von Bachofer. Die verwendeten Elektrotransfergeräte (Semi-Dry-Blotter) wurden von der ZMBH-Werkstatt hergestellt.

Portland:

Als Zentrifugen wurden die Biofuge Fresco und Pico von Haereus, eine Allegra 6R von Beckman-Coulter und eine Superspeed RC-2 von Sorvall mit den Rotoren SS-34 und HB-4 verwendet. Zur Transformation von Bakterien wurde der Electroporator 2510 von Eppendorf verwendet. Als Spektrophotometer wurde das BioPhotometer von Eppendorf verwendet. Zur Inkubation von 1,5 ml Tubes wurde der Eppendorf Thermomixer verwendet. Als Mikroskop diente ein Diavert-Mikroskop von Fisher und ein E800 Fluoreszenz-Mikroskop von Nikon mit einem PlanAPO 100x/1.4 Ölimmersionsobjektiv. Die Bilder wurden mit einer CoolsnapHQ Kamera von Photometrics und dem Programm „Metamorph“ der Universal Imaging Corp. aufgenommen. Die verwendete HPLC-Anlage und Elektrotransfergeräte (Semi-Dry-Blotter) wurden aus Heidelberg mitgenommen. Für die Analyse der Oligosaccharide wurde eine Supelco LC-NH2 Säule (250x4.6 mm) und eine LC-NH2 Vorsäule von Sigma verwendet. Die Detektion von ^3H -

und ^{32}P -Signalen erfolgte mittels des Szintillationszählers LS 3801 von Beckman-Coulter. PCR-Reaktionen wurden in dem Programmable Thermal Controller PTC-100 von MJ Research Inc. durchgeführt. DNA-Gele wurden mit dem Multi Imaging Light Cabinet von Alpha Innotech Corp. fotografiert. Zur Trocknung von Proben wurde das Integrated SpeedVac System ISS100 von Savant verwendet. Als Phosphoimager diente der Cyclone von Packard. Zum Abwiegen der Proben wurde die Sartorius CP64 Feinwaage und die Scout Pro von Ohaus verwendet.

4.1.2 Chemikalien

Heidelberg:

Am ZMBH wurden alle verwendeten Chemikalien, falls nicht anders erwähnt, von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Agarose, Hefeextrakt, Pepton, Yeast Nitrogen Base, Agar, 1 kb DNA Leiter von Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland); Nitrozellulose-Filter (BA85), Whatman 3MM von Schleicher und Schuell GmbH (Dassel, Deutschland); HEPES von AppliChem (Darmstadt, Deutschland); Acrylamidlösung von National Diagnostics (Atlanta/GA, USA); TEMED und Milchpulver von Fluka (Neu-Ulm, Deutschland); Nucleobond AX100-2000 von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland); X-OMAT AR Filme von Kodak (Rochester, USA); QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit und QIAprep Spin Mini Prep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland); Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit von Packard (Groningen, Deutschland); „prestained“ Proteinmarker („broad range“) von New England Biolabs GmbH (Schwalbach/Taunus, Deutschland).

Portland:

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und sonstige Materialien wurden, falls nicht anders erwähnt über Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), Fisher Scientific (Hampton, NH, USA), ISC Bioexpress (Kaysville, UT, USA) und VWR (West Chester, PA, USA) bezogen. QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit und QIAprep Spin Mini Prep Kit von Qiagen (Valencia, CA, USA); GenElute Plasmid Miniprep und Maxiprep Kits von Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); X-OMAT AR Filme von Kodak (Rochester, USA); GeneMate BlueAutoradiography Film von ISC

Bioexpress (Kaysville, UT, USA); Nitrozellulose-Filter (BA85) und Whatman 3MM von Fisher Scientific, EcoLume und EcoLight(+) Szintillationsflüssigkeit von MP Biomedicals; chemische Kreuzvernetzer (BMH) von Pierce (Rockford, USA). Entionisiertes Wasser wurde der Anlage PureLabs PL514 von ELGA entnommen und sterilisiert. [³H]D-Inositol und [³²P]-g-ATP wurden von PerkinElmer (Wellesley, MA, USA) bezogen.

4.1.3 Enzyme

Heidelberg:

Am ZMBH wurden Restriktionsenzyme, alkalische Phosphatase und T4-DNA Ligase sowie ihre Puffer von New England Biolabs GmbH (Schwalbach/Taunus, Deutschland) bzw. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Taq Polymerase wurde bei TaKaRa (Shiga, Japan), Zymolyase wurde von ICN Pharmaceuticals (Meckenheim, Deutschland) bzw. Medac (Wedel, Deutschland) bezogen.

Portland:

Restriktionsenzyme, alkalische Phosphatase, Taq-Polymerase, T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Kinase sowie ihre Puffer wurden entweder von New England Biolabs (Beverly, MA, USA) oder Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) bezogen. 100bp-DNA Marker wurde von New England Biolabs bezogen, der 1kb-DNA Marker stammte von ISC Bioexpress.

4.1.4 Oligonukleotide

Heidelberg:

Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) und Biospring (Frankfurt, Deutschland) synthetisiert.

Portland:

Oligonukleotide wurden von Operon (Huntsville, AL, USA) synthetisiert.

4.1.5 Antikörper

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung	Maus	Kaninchen	Herkunft
a-GFP	1:2400		X	Sigma-Aldrich
a-Sac1p (MK)	1:1.000.000	X		Vytas Bankaitis
a-Glukose-6P-Dehydrogenase	1:100.000		X	Sigma-Aldrich

4.1.6 Lösungen und Reagenzien

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit entionisiertem und sterilisiertem H₂O aus der Millipore-Anlage angesetzt.

4x SDS-Gel-Ladepuffer	6x DNA-Probenpuffer	SDS-Elektrophorese-Puffer	1x TAE
200 mM Tris-HCl pH 6,8 40% (v/v) Glycerin 8% (w/v) SDS 400 mM DTT 0,8% (w/v) Bromphenolblau	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen-Cyanolblau 30% Glycerin in H ₂ O	1,44% Glycerin 0,3% Tris-Base 0,1% SDS	40 mM Tris-Acetat 2 mM EDTA pH auf 7,8 mit Eisessig einstellen

1 M HEPES pH 7,4	100 mM PMSF	0,5 M DTT	2,5 M Sucrose
23,83 g in 100 ml ddH ₂ O; pH mit NaOH einstellen	17,42 mg in 1 ml Iso- propanol	76 mg in 1 ml ddH ₂ O	171,15g Sucrose auf 200ml ddH ₂ O

50% PEG	1 M LiOAc	10% Triton-X-100	10% SDS
50 g (w/v) auf 100 ml ddH ₂ O	10,2 g (w/v) in 100 ml ddH ₂ O	10 g (w/v) auf 100 ml ddH ₂ O	10 g (w/v) auf 100 ml ddH ₂ O

1 M Tris-HCl	0,5 M EDTA	TE pH 8,0	KP ₁ -Puffer pH 7,4
12,11 g (w/v) in 100 ml ddH ₂ O; mit HCl auf gewünschten pH einstellen	18,6 g (w/v) in 100 ml ddH ₂ O; mit NaOH- Plätzchen in Lösung bringen	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA	80,2 ml 1M K ₂ HPO ₄ 19,8 ml 1 M KH ₂ PO ₄

10x PBS	Tris/HCl	PonceauS	2 M KoAc
80g NaCl 2g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g NaH ₂ PO ₄ auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen pH auf 7,2 mit NaOH bzw. HCl einstellen	12,11g auf 100ml mit ddH ₂ O auffüllen gewünschten pH mit HCl einstellen	0,2% PonceauS 3% Trichloressigsäure (TCA)	9,8 g KoAC auf 50ml ddH ₂ O

Pro 500 μ l SDS-Gel-Ladepuffer wird kurz vor Verwendung 15 μ l 100mM PMSF zugegeben.

2x und 1x SDS-Gel-Ladepuffer wurden durch Verdünnen mit Wasser hergestellt.

4.1.7 Flüssigmedien und Platten

4.1.7.1 Flüssigmedien

Nach Maniatis et al. „Molecular Cloning“ und Adams et al. „Methods in Yeast Genetics.“
Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium; zur Herstellung der Medien wurden sterile Lösungen verwendet bzw. das Medium wurde nach Ansetzen autoklaviert.

YEP	YPD	HC	LB	LB/Amp	SOB
10 g Hefeextrakt 20 g Pepton	950 ml YEP 50 ml 40% Gluc	100 ml 10x YNB 100 ml 10x HC- drop out 50 ml 40% Gluc 35 ml Ura 20 ml Ade 12 ml Lys 8 ml Trp 4 ml Leu 2 ml His	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl	1 l LB 1 ml 10 mg/ml Ampicillin	20 g Pepton 5 g Hefeextrakt 0.58 g NaCl 0.19 g KCl

10x YNB	10x HC drop out
14,5 g yeast nitrogen base 50 g (NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g Met 0,6 g Tyr 0,8 g Ile 0,5 g Phe 1,0 g Glu 2,0 g Thr 1,0 g Asp 1,5 g Val 4,0 g Ser 0,2 g Arg

Die Konzentration der eingesetzten Aminosäurenstocklösungen war wie folgt:

Adenin (Ade) und Uracil (Ura): 1 g/l

Tryptophan (Trp), Histidin (His) und Lysin (Lys): 10 g/l

Leucin (Leu): 20 g/l

Für selektive Medien wurden die entsprechenden Amminosäuren dem HC Medium nicht zugegeben. (z.B. HC-Ura, ohne die 35ml Ura)

4.1.7.2 Platten

Für die Herstellung von Platten wurde zu 1 l Flüssigmedium jeweils 20 g Agar gegeben.

Inositolfreie Platten: Das HC-Medium wurde wie erwähnt hergestellt, mit dem Unterschied, dass anstatt des normalen 10x YNB inositolfreies 10x YNB (QBIOgene, Morgan Irvine, CA, USA) verwendet wurde.

5-FOA Platten: Zugabe von 1 mg/ml 5'-FOA („5-FLUOROURACIL“) zum entsprechenden Medium (pH sollte ca. 3 sein)

DTT-haltige Platten: zu YPD-Platten wurde vor dem Gießen DTT zu einer finalen Konzentration von 5 mM zugefügt.

4.1.8 Hefestämme

4.1.8.1 Vorhandene Hefestämme

Name	Genotyp	Ursprung
ATY201 (ATY 6211)	MAT \square <i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG</i>	(Schorr et al., 2001)
ATY202 (ATY 6212)	MAT \square <i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP1</i>	(Schorr et al., 2001)
STY39	MATa <i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP</i>	Sabina Tahirovic
STY40	MATa <i>leu2-3, 112 ura3-52 his3-delta200 trp1-delta901 lys2-801 suc2-delta9 sac1::TRP1 stt4::HIS3 pSTT4-4 (LEU2 CEN6 stt4-4)</i>	Sabina Tahirovic
STY47	<i>Pik1::ADE2-1 sac1::TRP YEplac181::pik1-12</i>	Sabina Tahirovic

4.1.8.2 Konstruierte Hefestämme

Name	Ausgangsstamm	Genotyp
PMY434	ATY201	MAT \square <i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG opi1::HIS3</i>
PMY435	STY39	MATa <i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP opi1::HIS3</i>

4.1.9 Plasmide

4.1.9.1 Vorhandene Plasmide

Plasmidname	Beschreibung	Ursprung
YCplac33	<i>CEN ARS URA3 AmpR GAL1/10</i>	(Gietz and Sugino, 1988)
pGK26	<i>CEN ARS URA3 AmpR SAC1-Promotor-GFP</i>	Gerline Konrad
pFAPP1	<i>2m URA3 GFP-PH-FAPP1</i>	(Stefan et al., 2002)
pPLCd1	<i>2m URA3 GFP-2xPH-PLCd1</i>	(Stefan et al., 2002)
pCB251	<i>2m URA3 GFP-FYVE-EEA1</i>	(Burd and Emr, 1998)

4.1.9.2 Konstruierte Plasmide

pAK8:

Die Promotorregion von *SAC1* (500 Basenpaare stromaufwärts vom Startcodon) wurde mit den Primern SACPM5Ec-5 und SACPM3ATGBa-3 amplifiziert und mit EcoRI und BamHI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in den mit EcoRI und BamHI verdauten Vektor YCplac33 kloniert.

pAK9:

Das *LacZ*-Gen wurde mittels BamHI-Verdau aus dem Vektor PZL4024 geschnitten und in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pAK8 kloniert.

pAK10:

Der Bereich von -497 bis -150 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern SACPM5Ec-5 und Sac1prom-3-3bamh1 amplifiziert und mit EcoRI und BamHI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in den mit EcoRI und BamHI verdauten Vektor YCplac33 kloniert.

pAK11:

Das *LacZ*-Gen wurde mittels BamHI-Verdau aus dem Vektor PZL4024 geschnitten und in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pAK10 kloniert.

pAK14:

Der Bereich von -317 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern *sac1prom-4a-3ecor1* und *SACPM3ATGBa-3* amplifiziert und mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Anschließend wurde das Fragment in den mit *EcoRI* und *BamHI* verdauten Vektor *YCplac33* kloniert.

pAK15:

Das *LacZ*-Gen wurde mittels *BamHI*-Verdau aus dem Vektor *PZL4024* geschnitten und in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors *pAK14* kloniert.

pAK29:

Der Bereich von -242 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern *sac1prom-11-3xho1* und *sac1prom-12-not1* amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor *pGEM-T Easy* der Firma *Promega* kloniert. Von dort wurde es mit *XhoI* und *NotI* herausgeschnitten und anschließend in den mit *XhoI* und *NotI* verdauten Vektor *pGK26* kloniert.

pAK30:

Der Bereich von -170 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern *sac1prom-11-3xho1* und *sac1prom-13-not1* amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor *pGEM-T Easy* der Firma *Promega* kloniert. Von dort wurde es mit *XhoI* und *NotI* herausgeschnitten und anschließend in den mit *XhoI* und *NotI* verdauten Vektor *pGK26* kloniert.

pAK34:

Der Bereich von -497 bis -150 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern *sac1prom-9-3xho1* und *sac1prom-8-not1* amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor *pGEM-T Easy* der Firma *Promega* kloniert. Von dort wurde es mit *XhoI* und *NotI* herausgeschnitten und anschließend in den mit *XhoI* und *NotI* verdauten Vektor *pGK26* kloniert.

pAK36:

Der Bereich von -125 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern sac1prom-11-3xho1 und sac1prom-14-not1 amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor pGEM-T Easy der Firma Promega kloniert. Von dort wurde es mit XhoI und NotI herausgeschnitten und anschließend in den mit XhoI und NotI verdauten Vektor pGK26 kloniert.

pAK38:

Der Bereich von -83 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern sac1prom-11-3xho1 und sac1prom-15-not1 amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor pGEM-T Easy der Firma Promega kloniert. Von dort wurde es mit XhoI und NotI herausgeschnitten und anschließend in den mit XhoI und NotI verdauten Vektor pGK26 kloniert.

pAK40

Der Bereich von -114 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern sac1prom-11-3xho1 und sac1prom-17-not1 amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor pGEM-T Easy der Firma Promega kloniert. Von dort wurde es mit XhoI und NotI herausgeschnitten und anschließend in den mit XhoI und NotI verdauten Vektor pGK26 kloniert.

pAK42:

Der Bereich von -100 bis -1 innerhalb der Promotorregion von *SAC1* wurde mit den Primern sac1prom-11-3xho1 und sac1prom-16-not1 amplifiziert. Das Fragment wurde in den Subklonierungsvektor pGEM-T Easy der Firma Promega kloniert. Von dort wurde es mit XhoI und NotI herausgeschnitten und anschließend in den mit XhoI und NotI verdauten Vektor pGK26 kloniert.

pAK47:

Mit Hilfe der Primer *sacI*prom-Del-1-5 und *sacI*prom-Del-1-3 und des QuikChange II-Mutagenesekits der Firma Stratagene wurde der Basenbereich von –100 bis –84 der *SACI*-Promotorregion innerhalb des Vektors pGK26 gelöscht.

pAK48:

Mit Hilfe der Primer *sacI*prom-Del-2-5 und *sacI*prom-Del-2-3 und des QuikChange II-Mutagenesekits der Firma Stratagene wurde der Basenbereich von –83 bis –70 der *SACI*-Promotorregion innerhalb des Vektors pGK26 gelöscht.

pAK49:

Mit Hilfe der Primer *sacI*prom-Del-3-5 und *sacI*prom-Del-3-3 und des QuikChange II-Mutagenesekits der Firma Stratagene wurde der Basenbereich von –91 bis –84 der *SACI*-Promotorregion innerhalb des Vektors pGK26 gelöscht.

pAK47:

Mit Hilfe der Primer *sacI*prom-Del-4-5 und *sacI*prom-Del-4-3 und des QuikChange II-Mutagenesekits der Firma Stratagene wurde der Basenbereich von –100 bis –92 der *SACI*-Promotorregion innerhalb des Vektors pGK26 gelöscht.

4.1.10 Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
<i>SacI</i> prom-4a-3ecor1	GCGAATTCGCCAAGACAGTGGCCTTCCCT
SACPM3ATGBa-3	GCGGATCCATATCTAGACGAGAAAATATAC
<i>SacI</i> prom-3-3bamh1	GCGGATCCATTGTGGGTAAGCAGTAGTGCAG
SACPM5Ec-5	GCGAATTCGCTACCACATCCCCTGACGTC
<i>SacI</i> prom-8-5not1	TTGCGGCCGCGCTACCACATCCCCTGACGTC
<i>SacI</i> prom-9-3xho1	GGCTCGAGTGTGGGTAAGCAGTAGTGCAG
<i>SacI</i> prom-12-5not1	TTGCGGCCGCCAAGCCTCGCTCCTATTGT
<i>SacI</i> prom-11-3xho1	GGCTCGAGATCTAGACGAGAAAATATACG
<i>SacI</i> prom-13-5not1	TTGCGGCCGCCTGCACTACTGCTTACCCACA

SacIprom-14-5not1	TTGCGGCCGCGAAGTTGAAAAGGCAAGGGA
SacIprom-17-5not1	TTGCGGCCGCGGCAAGGGAAAAATACCACA
SacIprom-16-5not1	TTGCGGCCGCGACCACAGGTTTAGATAAGGA
SacIprom-15-5not1	TTGCGGCCGCGGAAATAGGAGAAAGGATTAG
SacIProm-Del-1-5	GAAAAGGCAAGGGAAAAATGGAAATAGGAGAAAGG
SacIProm-Del-1-3	CCTTTCTCCTATTTCCATTTTTCCCTTGCCTTTTC
SacIProm-Del-2-5	CCACAGGTTTAGATAAGGATTAGAAACCATATCC
SacIProm-Del-2-3	GGATATGGTTTCTAATCCTTATCTAAACCTGTGG
SacIProm-Del-3-5	GGGAAAAATACCACAGGTGGAAATAGGAGAAAGG
SacIProm-Del-3-3	CCTTTCTCCTATTTCCACCTGTGGTATTTTTCCC
SacIProm-Del4-5	GGCAAGGGAAAAATATTAGATAAGGAAATAGG
SacIProm-Del4-3	CCTATTTCCCTTATCTAATATTTTTCCCTTGCC
TemplateA-5	GGCAAGGGAAAAATACCACAGGTTTAGATAAAGGAAATAG
TemplateA-3	CTATTTCCCTTATCTAAACCTGTGGTATTTTTCCCTTGCC
TemplateA-M1-5	GGCAAGGGAAAAATTGGACAGGTTTAGATAAAGGAAATAG
TemplateA-M1-3	CTATTTCCCTTATCTAAACCTGTCCAATTTTTCCCTTGCC
TemplateA-M2-5	GGCAAGGGAAAAATACCTGTGGTTTAGATAAAGGAAATAG
TemplateA-M2-3	CTATTTCCCTTATCTAAACCACAGGTATTTTTCCCTTGCC
TemplateA-M3-5	GGCAAGGGAAAAATACCACACCATTAGATAAAGGAAATAG
TemplateA-M3-3	CTATTTCCCTTATCTAATGGTGTGGTATTTTTCCCTTGCC
TemplateA-M5-5	GGCAAGGGAAATTAACCACAGGTTTAGATAAAGGAAATAG
TemplateA-M5-3	CTATTTCCCTTATCTAAACCTGTGGTTAATTTCCCTTGCC
TemplateA-M6-5	GGCAAGGGAAAAATACCACAGGTAATGATAAAGGAAATAG
TemplateA-M6-3	CTATTTCCCTTATCATTACCTGTGGTATTTTTCCCTTGCC
Opi1K05	CATATCAGGCCAGAACGTGGCATTGTTTACAGTGCTGAAG ATTGTACTGCTGAGAGTGCAC
Opi1K03	AACTATATTATCCGTATAATATTACTGGTGGTAATGCTG TGCGGTATTTACACCG

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Konzentration der Primer wurde auf 100 pmol/μl eingestellt

Für Genamplifikationen für anschließende Klonierungsexperimente wurde folgendes Protokoll verwendet:

Reaktionsansatz	PCR-Protokoll
5 ng Matritzen-DNA 1 μmol jedes Primers 0,2 mM dNTPs 1 x Polymerase-Puffer 1 Unit Taq Polymerase 1 Unit Pfu Polymerase mit ddH ₂ O auf 100 μl auffüllen	Deckeltemperatur: 105°C Schritt 1: 94°C, 30 sec Schritt 2: 94°C, 30 sec Schritt 3: 54°C, 30 sec Schritt 4: 72°C, 1,45 min Schritt 5: 72°C, 5 min Schritt 6: 4°C, Pause Schleife von Schritt 4 zu Schritt 2; 29 Zyklen

4.2.1.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt wurde entweder vollständig auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die PCR-Reaktion zu überprüfen, die DNA-Fragmente mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen, Katalognummer 28706 nach dem mitgelieferten Protokoll aufgereinigt, oder es wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen, Katalognummer: 28104 verwendet, um restliche Primer, nicht eingebaute dNTPs sowie die Polymerasen zu entfernen; auch diese Reinigung wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

4.2.1.3 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden entsprechend der Empfehlungen des Herstellers der Restriktionsenzyme durchgeführt. Die Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Units}_{\text{benötigt}} = (\text{Schnittstellen/kb}) \times (\text{UF/hrs}) \times \mu\text{g zu schneidende DNA}$$

$$\text{UF (Unit Faktor)} = \text{kb der Referenz (z.B. } \mu\text{g)} / \text{Schnittstellen der Referenz}$$

Die Reaktion wurde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur durchgeführt. Die Verdauzeiten lagen je nach Ansatz bei 60-120 min.

Durch Inkubation bei 65°C für 20 min wurden die Enzyme inaktiviert.

4.2.1.4 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation von Vektoren, die mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurden, zu verhindern bzw. um zu vermeiden, dass ein Vektor mit einem Vektor ligiert, wurden Vektoren nach Restriktionsverdau mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit 1 μ l Alkalischer Phosphatase bei 37°C für 60 min im vom Hersteller beigefügten Puffer. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms mittels 5 mM EDTA und 15 minütiger Inkubation bei 65°C.

4.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen, Katalognummer 28706, nach dem mitgelieferten Protokoll aufgereinigt.

4.2.1.6 Ligation von DNA

Ligationen von Vektor und Insert wurden mittels 1 Unit T4-Ligase in einem Volumen von 10-20 μ l bei 16°C über Nacht durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert wurde in mehreren Ansätzen variiert, um das beste Verhältnis für eine erfolgreiche Ligation zu bestimmen. Der komplette Ligationsansatz wurde jeweils nach Entsalzung mittels Nitrocellulose-Filtern von Millipore in elektrokompetente *E.coli* Zellen transformiert.

4.2.1.7 Transformationsprotokolle

4.2.1.7.1 Transformation von *E.coli* Zellen

4.2.1.7.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Zellen wurde der Stamm DH5 α der Firma CLONTECH verwendet. 5 ml SOB-Medium wurden mit DH5 α -Zellen angeimpft und μ N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml SOB-Medium mit der Vorkultur angeimpft; nachdem die Zellen bis zu einer OD_{600nm}/ml von 0.8 gewachsen waren, wurden sie für 10 min bei 4°C und 3500 rpm pelletiert, das Pellet in 1,4%igem Glycerol resuspendiert, anschließend zweimal in 1,4%igem Glycerol gewaschen und

danach für 7 min bei 4°C und 3500 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 2-3 Volumen 15%igem Glycerol resuspendiert.

Die Zeitkonstante der resuspendierten Zellen wurde mit folgenden Einstellungen des Elektroporationsgeräts getestet: 2,5 kV, 200 μ s und 25 μ F. War die Zeitkonstante niedriger als 4,6 wurde nochmals mit 1,4 %igem Glycerol gewaschen.

Die elektrokompenten Zellen wurden in 120 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.1.7.1.2 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Für eine Transformation wurden 50 μ l elektrokompente *E.coli* Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellen wurden in einer Elektroporationsapparatur mit folgenden Einstellungen transformiert: 2,5 kV, 200 μ s und 25 μ F. Nach der Poration erfolgte die Überführung der Zellen in 200 μ l LB-Medium und eine Inkubation bei 37°C für 1–1,5 Stunden. Anschließend wurden die Zellen auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

4.2.1.7.2 Transformation von Hefezellen

4.2.1.7.2.1 Niedrigeffiziente Transformation von Hefezellen

Einige Hefekolonien wurden in 200 μ l Wasser resuspendiert, stark geschüttelt (Vortex) und abzentrifugiert. Das Wasser wurde entfernt, zum Sediment wurden 2 μ l einzelsträngige Lachssperma-DNA (10mg/ml) und 2 μ l (ca. 1-4 μ g DNA) der zu transformierenden DNA pipettiert. Nach kurzem starken Schütteln (Vortex) wurden 500 μ l eines Transformationsmixes (40% PEG, 0,1M LiOAc, 10mM Tris-HCl pH 7,5 und 1 mM EDTA) zum Ansatz pipettiert. Der Ansatz wurde für 90s stark geschüttelt (Vortex) und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Teil des Ansatzes auf einer selektiven Platte, der andere Teil auf einer YPD Platte als Kontrolle ausplattiert.

4.2.1.7.2.2 Hocheffiziente Transformation von Hefezellen

5 ml YPD-Medium wurden mit einer Kolonie des zu transformierenden Hefestammes angesetzt und üN bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Die Zelldichtebestimmung der üN-

Kultur erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer. 50 ml YPD-Medium wurden auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und bei 30°C und 120 rpm inkubiert bis eine Dichte von 2×10^7 Zellen/ml erreicht war. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation bei $3000 \times g$ für 5 min geerntet, anschließend in 25 ml sterilem H_2O gewaschen und erneut sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml 100 mM LiOAc resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Die Resuspension des Sediments erfolgte in 400 μl 100 mM LiOAc, woraus ein Endvolumen von ca. 500 μl und eine Zelldichte von 2×10^9 Zellen/ml resultierte. Nach kurzem starkem schütteln (Vortex) wurde die Zellsuspension in 10 Aliquots à 50 μl aufgeteilt.

Es wurde ein Aliquot für die Transformation verwendet, die restlichen Aliquots können für ca. 3-4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden, wobei allerdings ein Effizienzverlust über die Zeit festzustellen ist. Die Transformation eines Aliquots wurde wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden kurz sedimentiert, die LiOAc-Lösung entfernt und die folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zugegeben:

240 μl PEG (50% w/v)

36 μl 1.0 M LiOAc

5 μl Lachssperma-DNA (10 mg/ml)

75 μl H_2O und zu transformierende DNA (0,1-10 μg ; i.d.R. wurden 4-5 μg eingesetzt)

Die Zellen wurden bis zur vollständigen Resuspension stark geschüttelt (Vortex) und anschließend für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ein 20-25 minütiger Hitzeschock bei 42°C , kurzes Sedimentieren der Zellen und die Aufnahme in 200 μl sterilem H_2O . Nach Resuspension der Zellen wurden diese auf einer selektiven Platte ausplattiert.

4.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen

4.2.1.8.1 Mini-Präparation

Für eine Mini-Präparation wurde eine 5 ml LB/Amp-Kultur mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Präparation wurden 4 ml der üN-Kultur eingesetzt, 1 ml wurde zur evtl. Inokulation einer größeren Kultur zurückgehalten. Die Mini-Präparation erfolgte mittels „QIAprep Spin Mini Prep Kit“ von QIAGEN oder „GenElute Plasmid Miniprep Kit“ von Sigma-Aldrich nach dem mitgelieferten Protokoll. Für analytische Verdaue wurden i.d.R. 4 µl der Präparation eingesetzt.

4.2.1.8.2 Maxi-Präparation

Für eine Maxi-Präparation wurde eine 200 ml LB/Amp-Kultur mit einer *E. coli* Kolonie inokuliert und üN bei 37°C inkubiert. Die Maxi-Präparation erfolgte mittels „NUCLEOBOND Kit“ von Macherey-Nagel oder „GenElute Plasmid Maxiprep Kit“ von Sigma-Aldrich. Die Quantifizierung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bei OD_{260nm} am Spektrophotometer.

4.2.1.9 Agarose-Gele

Für die Analyse von DNA, z.B. nach PCR oder Restriktionsverdau, wurden 0,8%ige Agarose-Gele verwendet. 0,8 g Agarose wurden dafür in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht und mit 10 µl EtBr-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nach Erstarren der Agarose in einer Gelkammer wurde die mit DNA-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) gemischte DNA im elektrischen Feld bei konstanter Spannung von 50 bzw. 80 V (kleine oder große Gelkammer) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet.

4.2.1.10 Phenolextraktion

Die zu reinigende DNA-Lösung wurde mit einem gleichen Volumen PCI (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol) in einem Mischungsverhältnis von 25 : 24 : 1 versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur invertiert. Anschließend wurde zu Phasentrennung für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt. Danach wurde ein gleiches Volumen CI im Mischungsverhältnis von 24 : 1 zugegeben, für 2 Minuten gemischt und

bei 10000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.2.1.11 Ethanolpräzipitation

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und der Salzgehalt mit 3 M NaOAc pH 5.5 auf eine finale Konzentration von 0,3 M eingestellt. Ein 2 – 2,5 faches Volumen von 100% Ethanol wurde zugegeben und die Lösung bei -80°C für 20 Minuten (oder über Nacht) gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand verworfen und das DNA-Sediment mit 70% Ethanol gewaschen. Es wurde erneut für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand verworfen, die DNA luftgetrocknet und anschließend in TE Puffer oder Wasser resuspendiert.

4.2.1.12 Glycerinstocks zur Aufbewahrung von Hefestämmen

Glycerin-Stocks dienen der Aufbewahrung von Zellen über längere Zeit bei -80° C. Dazu wurden die Stämme in 5 ml Flüssigmedium über Nacht bei 30° C bis in die stationäre Phase kultiviert. Je 0.5 ml der Kultur wurden mit 0.5 ml 30%igem Glycerin gemischt und langsam auf -80°C gebracht. Pro Stamm wurden 2 Proben angelegt.

4.2.1.13 Präparation genomischer Hefe-DNA

10 ml YPD-Medium wurden mit einer einzigen, großen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 x g pelletiert, das Pellet in 500 µl Wasser resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Nach erneutem Pelletieren und Abgießen des Überstands, wurden die Zellen kurz geschüttelt, um sie in der Restflüssigkeit zu resuspendieren. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), 200 µl PCI (Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis (25:24:1) und ca. 300 mg Glaskügelchen zugegeben und für 3-4 min stark geschüttelt. Nach Zugabe von 200 µl TE pH 8 wurde 5 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit 1 ml 100%igem Ethanol gemischt und anschließend für 2 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und

das Pellet in 400 ml TE pH 8 und 3 ml RNase A (10 mg/ml) resuspendiert. Es wurde 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 ml NH_4OAc sowie 1 ml 100%iges EtOH dazugegeben, invertiert und für 2 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 50 ml TE pH 8 resuspendiert.

Zur Amplifikation eines spezifischen Gens mittels PCR wurden 2 µl der genomischen DNA-Präparation eingesetzt

5.2.1.14 Gen „knock out“ nach der Ein-Schritt-Methode

In Hefe können Gene mittels dem PCR-basierten Gen „knock out“ (Baudin et al., 1993; Lorenz et al., 1995) gegen ein Markergen (*URA3*, *ADE2*, *LEU2*, *LYS2*, *TRP1* oder *HIS3*) ausgetauscht werden. Dazu wird das Markergen mittels PCR amplifiziert. Homologe Rekombination mit linearen DNA-Fragmenten in Hefe ist sehr effizient. Ca. 40 Basenpaare auf beiden Seiten des Markergens, die durch die PCR in die DNA-Sequenz eingeführt werden, sind ausreichend, um mit entsprechenden homologen Regionen vor und nach dem gewünschten Zielgen zu rekombinieren. Dadurch kann das Zielgen relativ einfach durch das Markergen ausgetauscht werden. Zellen, die nach der Transformation mit dem PCR-Produkt auf entsprechen selektiven Platten wachsen, enthalten das Markergen. Es muss allerdings per PCR kontrolliert werden, ob die Integration an der gewünschten Stelle stattgefunden hat und das Ziel Gen gegen das Markergen ausgetauscht wurde. Der Gen-„knock out“ wurde wie in (Amberg et al., 2005) beschrieben durchgeführt.

4.2.2 Biochemische Methoden

4.2.2.1 Präparation von zellulären Fraktionen

4.2.2.1.1 Hefezellaufschluss

10 ml selektives oder YPD Medium wurden mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler bei 120 rpm bis zu maximal 1 OD_{600} wachsen gelassen, um zu gewährleisten, dass sie sich noch in der logarithmischen Phase befinden. Dann wurden 4 OD_{600} Zellen durch Zentrifugation (5min 4000rpm) geerntet und das Sediment mit destilliertem Wasser gewaschen, wieder zentrifugiert und das Sediment in

200 μ l 2x SDS-Gel-Ladepuffer (mit PMSF) und 5 μ l 100mM PMSF zusätzlich aufgenommen, ca. 200 μ l Glaskügelchen zugegeben, für 90 Sekunden stark geschüttelt (Vortex) und anschließend für 3 min bei 95°C aufgeköcht, dann für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und 20-30 μ l pro Probe auf ein Gel geladen. Die Proben können für spätere Analyse auch -20°C eingefroren werden.

4.2.2.1.2. Präparation von löslichen zellulären Proteinfractionen aus Hefe

Lösungen:

Extraktionspuffer	Ammoniumsulfatpuffer	Proteinpuffer
200 mM Tris pH 8.0 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 10 % Glyzerin 5 mM DTT 1 mM PMSF 1 x Roche Complete	100 % (NH ₄) ₂ SO ₄ angesetzt in 20 mM Hepes pH 8.0	20 mM Hepes pH 8.0 5 mM EDTA 20 % Glyzerin 5 mM DTT 1 mM PMSF 1 x Roche Complete

Es wurde eine 50 ml Vorkultur in YPD angesetzt und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Ausgehend von der OD₆₀₀ der Vorkultur wurde eine 1 l Kultur angeimpft, die am darauf folgenden Morgen eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht haben sollte. Die 1 l Kultur wurde ebenfalls bei 30°C und 120 rpm inkubiert und nach Erreichen der erforderlichen OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Hefezellen für 5 min bei 3000 g und 4°C geerntet. Anschließend wurde einmal mit 10 ml Extraktionspuffer gewaschen, die Suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und erneut pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Falls eingefroren wurden die Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens an Glaskügelchen wurden die Zellen durch starkes Schütteln (Vortex) aufgeschlossen (6 x 15 sec). Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden zelluläre Bruchstücke durch Zentrifugation entfernt (5 min, 3000g, 4°C) und das Zellextrakt in Eppendorf-Zentrifugationsröhrchen überführt. Weitere Aufreinigung des Extraktes erfolgte durch erneute Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde ein weiteres Mal in ein neues Röhrchen überführt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (60 min,

4°C). Die nun klaren Überstände wurden in neue Eppendorf-Zentrifugationsröhrchen überführt und Ammoniumsulfatlösung so zugegeben, dass eine finale Konzentration von 30% bzw. 40% erreicht wurde. Die Proteine wurden bei 4°C auf einem Dreher für 30 Minuten gefällt. Anschließend wurden die Proteine bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und die Proteinsedimente vorsichtig in Proteinpuffer resuspendiert. Proteinkonzentrationen wurden anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt.

4.2.2.1.3 Mikrosomen-Präparation

Lösungen:

Tris-Sulfat-Puffer	Sorbitol-Puffer	Spheroblastenmedium	Sucrose/Ficoll-Puffer
100 mM Tris-Sulfat pH 9,4 10 mM DTT	1,2 M Sorbitol 20 mM KPi-Puffer pH 7,4 5 mM DTT	Sorbitol-Puffer, der mit YPD statt H ₂ O angesetzt wurde	0,8 M Sucrose 1,5% (w/v) Ficoll 400 20 mM HEPES pH 7,4

Membran-Lyse-Puffer	0,5 M Sucrose	1,0 M Sucrose	Membranen-Aufbewahrungspuffer
50 mM KOAc 2 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,4 2 mM DTT 1 mM PMSF	0,5 M Sucrose 50 mM KOAc 2 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,4 1 mM DTT	1,0 M Sucrose 50 mM KOAc 2 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,4 1 mM DTT	0,25 M Sucrose 50 mM KOAc 1 mM DTT 20 mM HEPES pH 7,4 1 mM PMSF

Protokoll:

Eine 50 ml Vorkultur (YDP oder selektives Medium) wurde mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Ausgehend von der OD₆₀₀ der Vorkultur wurde eine 1 l Kultur angeimpft, die am darauf folgenden Morgen eine OD₆₀₀ von 0,25 oder 1,0 erreicht haben sollte. Die Berechnung der einzusetzenden Menge an Vorkultur erfolgte mit folgender Formel:

$$\ln(N/N_0) = (t/t_d)\ln 2$$

N = erforderliche End-OD₆₀₀

N₀ = Ausgangs-OD₆₀₀ der Vorkultur

t = Inkubationszeit der Kultur

t_d = Generationszeit (für ATY6211 ca. 2,25 h)

Die 1 l Kultur wurde ebenfalls bei 30°C und 120 rpm inkubiert und nach Erreichen der erforderlichen OD₆₀₀ von 1,0 wurden die Hefezellen für 5 min bei 4000 rpm in einem

Sorvall GS-3 Rotor geerntet. Anschließend wurde einmal mit H₂O gewaschen, die Suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und erneut pelletiert. Das Pellet konnte entweder bei –80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden.

Für die Weiterverarbeitung wurde das Pellet in 20 ml Tris-Sulfat-Puffer resuspendiert und 30 min bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Pelletierung der Zellen und das einmalige Waschen in Sorbitol-Puffer. Das Pellet wurde in 20 ml Spheroblasten-Medium mit 20 mg Zymolyase resuspendiert und 1 Stunde bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert, um die Zellwand abzubauen. Anschließend wurde die Suspension auf 10 ml 0,8 M Sucrose-Ficoll geschichtet (in zwei Corex-Röhrchen) und 15 min bei 4°C im Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Spheroblasten-Pellet in 18 ml Membran-Lyse-Puffer resuspendiert (je 9ml pro Corex) und im Potter homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 20 ml 0,5 M Sucrose gemischt und jeweils die Hälfte dieser Suspension wurde auf 10 ml 1,0 M Sucrose geschichtet (Corex) und für 15 min bei 4°C und 8000 rpm im Sorvall HB-4 Rotor zentrifugiert. Der erhaltene Überstand und die Interphase wurden abgenommen und die darin enthaltenen Mikrosomen für 30 min bei 4°C und 15000 rpm in einem Sorvall SS-34 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in Membranen-Aufbewahrungspuffer resuspendiert; es wurden 7 μ l der resuspendierten Mikrosomen und 693 μ l 2% SDS zur Bestimmung der OD₂₈₀ verwendet und daraus die Mikrosomen-Konzentration berechnet. Eine OD_{280nm} = 1 entspricht 100 OD/ml Mikrosomen. Anschließend wurden die Mikrosomen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

4.2.2.3 TCA-Fällung

Zu 100 μ l Proteinlösung wurden 60 μ l kaltes Aceton (100%) und 16 μ l kalte TCA (50%) pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt, für 40 min auf Eis inkubiert und danach bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Proteinsediment wurde zweimal mit 500 μ l kaltem 50%-igem Aceton gewaschen, jeweils zentrifugiert und dann auf Eis für 15-20 min getrocknet und anschließend in 1x SDS-Gel-Ladepuffer gelöst und für 3-5 min bei 95°C aufgeköcht.

4.2.2.4 Proteintrennung und Detektion

4.2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die proteinenthaltenden Proben wurden in SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen und aufgeköcht.

Proteinextrakte wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Plattengele (Sammelgel+Trenngel) in einem diskontinuierlichen Tris-Glycerin-Puffersystem (SDS-Elektrophorese Puffer) aufgetrennt. Die Elektrophorese eines 25 ml Gels wurde bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA durchgeführt.

10% Trenngel		7% Trenngel		Sammelgel
11,7 ml	Acrylamid (30%)	8,2 ml	Acrylamid (30%)	2,5 ml Acrylamid (30%)
16,4 ml	H ₂ O	19,4 ml	H ₂ O	9,4 ml H ₂ O
7,0 ml	2 M Tris-HCl pH 8,8	7,0 ml	2 M Tris-HCl pH 8,8	3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8
115 μ l	10% APS	115 μ l	10% APS	45 μ l 10% APS
350 μ l	10% SDS	350 μ l	10% SDS	150 μ l 10 % SDS
25 μ l	TEMED	25 μ l	TEMED	20 μ l TEMED

4.2.2.4.2 Western Blot

Der Aufbau eines Western Blots von unten nach oben, wenn die Kathode des Elektrotransfergerätes oben liegt, geschah wie folgt:

Anode

3 Lagen Whatmanpapier getränkt in Anodenpuffer 2

3 Lagen Whatmanpapier getränkt in Anodenpuffer 1

Nitrozellulosefilter getränkt in Anodenpuffer 1

Polyacrylamidgel, vorher in Kathodenpuffer gewaschen

3 Lagen Whatmanpapier getränkt in Kathodenpuffer

Kathode

Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer
30 mM Tris 20% Methanol	300 mM Tris 20% Methanol	25 mM Tris 40mM Aminohexansäure 20% Methanol 0,01% SDS

Ein 25 ml Gel (Größe ca. 10 x 15 cm) wurde bei 272 mA für ein bis zwei Stunden geblottet, je nach Größe der Proteine.

Nach Beendigung des Blottens wurden die Markerbanden eingezeichnet und dann der Nitrozellulosefilter vier Mal in Wasser gewaschen und mit Ponceaulösung für 2 min gefärbt, um den Transfer der Proteine zu kontrollieren. Der Filter wurde dann mit Waschpuffer für 5 min auf einer Wippe entfärbt und dann für 30 min mit Blockpuffer inkubiert. Die Blocklösung wurde abgegossen und der Filter für 60 min (oder über Nacht bei 4°C) mit dem primären Antikörper (in 2% Milchpulver, 1x PBS und 0,1% Tween 20) inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 4 min wurde der Filter für 45 min mit peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörper, entweder Ziege-a-Maus oder Ziege-a-Kaninchen (in 2% Milchpulver, 1x PBS und 0,1% Tween 20) inkubiert. Der Filter wurde erneut 5-mal für 4 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Signaldetektion wurde der „BM Chemiluminescence Blotting Substrate Kit“ von Boehringer verwendet.

Waschpuffer	Blockpuffer
1 x PBS 0,1% Tween 20	10% Milchpulver 1 x PBS 0,5 % Tween 20

4.2.2.4.3 Blaufärbung mit Colloidal Blue

Die Färbung wurde mit Hilfe des „Colloidal Blue Stain Kit“ der Firma Novex anhand des mitgelieferten Protokolls durchgeführt. Das Gel wurde für mindestens 3 , maximal 12 Stunden in Färbelösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel für mindestens 7 Stunden in entionisiertem Wasser geschüttelt. Sollte das Gel für länger als 3 Tage aufbewahrt werden, wurde das Wasser durch 20% Ammoniumsulfat ersetzt und das Gel bei 4°C verstaut.

100 ml Färbelösung
55 ml entionisiertes Wasser 20 ml Methanol 5 ml Stainer B 20 ml Stainer A

4.2.2.4.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach Blum *et al.* Elektrophoresis 8, Seite 934.

Dafür benötigte Lösungen:

Lösung	Reagenz	Menge
Destain	Essigsäure Methanol ddH ₂ O	110 ml 250 ml 640 ml
Natriumthiosulfat-Lsg.	Na ₂ S ₂ O ₃ ddH ₂ O	20 mg = 1 Kristall auf 100 ml
Silberbad	AgNO ₃ Formaldehyd ddH ₂ O	200 mg 75 µl auf 100 ml
Entwickler	Na ₂ CO ₃ Na ₂ S ₂ O ₃ -Lsg. Formaldehyd ddH ₂ O	6 g 2 ml 50 µl auf 100 ml

Das Gel wurde in Destain für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimal für zehn Minuten in ddH₂O gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in 98 ml Natriumthiosulfat-Lsg. für eine Minute und erneutes dreimaliges Waschen in ddH₂O. Nun wurde das Gel für 20 Minuten in Silberbad inkubiert, und anschließend kurz in ddH₂O gewaschen (zweimal für je 20 Sekunden). Es folgte eine Inkubation in Entwicklerlösung mit anschließendem Stoppen der Reaktion in Destainlösung.

4.2.2.4.5 Färbung mit Sypro-Orange

Das Gel wird zunächst in 200 ml Fixierlösung für 20 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Fixierlösung wird entfernt und mit 200 ml frischer Fixierlösung ersetzt und erneut unter leichtem Schütteln für 20 Minuten inkubiert. Der zweite Fixierschritt kann auch über Nacht erfolgen. Danach wird das Gel zwei mal für 20 Minuten in 200 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird das Gel in 200 ml Färbelösung für mindestens eine Stunde geschüttelt. Die Sensitivität kann bis zu einem Maximum von 4 Stunden Inkubationszeit erhöht werden. Danach erfolgt die Detektion mittels eines Gelscanners.

Fixierlösung	Waschpuffer	Färbelösung
40 % Ethanol 2 % Essigsäure 0,0005 % SDS	2 % Essigsäure 0,005 % SDS	2 % Essigsäure 0,005 % SDS 1:5000 verdünntes Sypro Orange

4.2.2.5 Phosphoinositidanalyse

Lösungen:

Inositolfreies HC-Medium: HC Medium, anstelle von 10x YNB wird 10x inositolfreies 10x YNB verwendet. Wurden inositolauxotrophe Stämme untersucht, so wurde das Medium mit 5,5 μM Inositol supplementiert.

Extraktionslösung A	Extraktionslösung B	Extraktionslösung C
0,1 M KCl 0,1 N HCl	2 M KCl 0,01 N HCl	Chloroform/Methanol/1 N HCl im Verhältnis (495:990:15)

Methylaminreagenz	Petroleum-Etherlösung
42,8% von 25% Methylamin 45,7% Methanol 11,4% 1-Butanol	1-Butanol/Petrolether/Ethylformat im Verhältnis (20:4:1)

Protokoll:

Es wurde eine 5 ml Vorkultur angesetzt und bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ in einer neuen 5 ml Kultur auf 0,2 eingestellt, 50 μCi [³H]-myo-Inositol zugegeben und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 inkubiert.

Die Zellen wurden durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 4000 rpm geerntet, das Zellpellet mit 5 ml kaltem Wasser (4°C) gewaschen, erneut pelletiert (an dieser Stelle können die Zellen auch bei -80°C eingefroren werden und später weiterbehandelt werden) und in 0,3 ml Wasser und 1,2 ml Ethanol resuspendiert. Um die Zellen aufzubrechen, wurden sie für 45 min bei 95°C inkubiert. Dabei sollte ein Großteil des Wassers und Ethanols entweichen. Danach wurden 2ml Extraktionslösung A, 7,5 ml Extraktionslösung C, 2,5 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz gut gemischt (Vortex). Nach Zugabe von 2,5 ml Extraktionslösung B und erneutem Mischen (Vortex) wurde der Ansatz für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Phasentrennung). Die untere Phase wurde abgesaugt und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 7,5 ml Extraktionslösung B wurde für 1 min stark geschüttelt (Vortex) und dann für 5 min bei 6000rpm zentrifugiert und danach die obere Phase verworfen. Die untere Phase wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet (an dieser Stelle kann wieder bei -80°C eingefroren werden). Das Lipidpellet wurde in 1,8 ml Methylaminreagenz resuspendiert und für 50 min bei 53°C inkubiert, um die Acylgruppen von den Fetten abzuspalten. Hier wurden 18 μl für eine Szintillationsmessung entnommen. Anschließend wurden 2 ml Wasser dazugegeben, das Ganze in einen Rundkolben überführt, in flüssigem Stickstoff

eingefroren und für ca. zwei Stunden lyophilisiert. Das getrocknete Pellet wurde in 1,8 ml Wasser resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nochmals lyophilisiert. Nach Zugabe von 2 ml Wasser und 2 ml Petroleum-Etherlösung und starkem Schütteln (Vortex) wurde die untere Phase in einen neuen Rundkolben überführt, nochmals mit 2 ml Petroleum-Etherlösung versetzt und stark geschüttelt (Vortex). Die untere Phase wurde in einen neuen Rundkolben überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann lyophilisiert (an dieser Stelle kann die Probe wieder bei -80°C eingefroren werden). Das Pellet wurde in 150 μl 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3,8 resuspendiert. 3 μl davon wurden für die Szintillationsmessung verwendet, der Rest wurde auf die HPLC Anlage geladen.

HPLC Konditionen:

Pumpe A: destilliertes, entionisiertes Wasser

Pumpe B: 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3,8

- 1) 0 % B für 10 min
- 2) von 0% auf 25 % B in 60 min
- 3) von 25% auf 100% B in 50min

Gesamtlaufzeit: 120 min

Flussrate: 1 ml/min

Die Retentionszeiten der Glycerolinositolphosphate war durchschnittlich (Schorr et al., 2001): Glycerolinositol(3)phosphat: 28,6 min; Glycerolinositol(4)phosphat: 30,6 min

Die Mengen in den Peaks wurden quantifiziert (WinFlow Software, Berthold, Bad Wildbach, Deutschland) und ins Verhältnis zur jeweils gesamten extrahierten Menge gesetzt.

4.2.2.6 „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA)

Radioaktive Markierung von DNA Oligomeren

Um kurze doppelsträngige DNA Stücke radioaktiv zu markieren wurden zunächst komplementäre Oligomere synthetisiert. Eines der beiden komplementären Oligomere wurde mit T4-Kinase und ^{32}P g-ATP radiomarkiert. Hierzu wurden 0.5 μg des Oligomers eingesetzt. Die Reaktion erfolge in einem Gesamtvolumen von 15 μl .

Reaktionsansatz	STE-Puffer
1 µl Oligomer (0.5 ug / ul)	10 mM Tris pH 7,5
7,5 µl entionisiertes Wasser	1 mM EDTA
1,5 µl 10 X T4 Kinasepuffer	100 mM NaCl
4 µl 32P g-ATP	
1 µl T4 Kinase	

Die Kinasereaktion wurde bei 37°C für 1 h durchgeführt. Danach wurde 60 µl STE-Puffer zum Reaktionsansatz zugegeben und mit Hilfe einer „Stratagene Push Column“ und dem mitgelieferten Protokoll freies ATP entfernt. Die radioaktiv markierten Oligomere lagen danach in ca. 150 µl STE Puffer vor. Um doppelsträngige Oligomere zu erhalten, wurden radioaktiv markierte Moleküle mit den komplementären, unmarkierten Strängen hybridisiert. Hierzu erfolgte die Zugabe von 1,5 µg unmarkiertem komplementärem Oligomer zum Reaktionsansatz. Die Probe wurde auf 100°C erhitzt und langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Effektivität der radioaktiven Markierung wurde mit einem Szintillationszählers gemessen.

Electrophoretic mobility shift assay

Für ein Standardexperiment wurden ca. 25 µg Zellextrakt und ca. 10,000 cpm des radioaktiven Oligomers eingesetzt. Die Reaktion erfolgte anhand dieses Ansatzes:

Reaktionsansatz
4 µl 5X EMSA Puffer
entionisiertes Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 ul
1 µl Poly dI/dC (1 ug / ul in TE)
1 µl BSA (10 mg / ml in TE)
1 µl radioaktiv markiertes Oligomer (10,000 cpm)
1 – 3 µl Hefezytosol

Die Proben wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf ein 5-%iges Polyacrylamidgel geladen. Das Gel lief bei einer Spannung von 150V für etwa 3 Stunden. Anschließend wurde das Gel getrocknet und radioaktive Banden mit einem Autoradiographiefilm detektiert.

5X EMSA Puffer	5X TBE	5% Polyacrylamidgel	Ladepuffer
50 mM HEPES pH 8,0	0,445 M Tris	0,5X TBE	0,2 % Bromphenolblau
375 mM Kcl	0,445 M Borsäure	5 % Polyacrylamid	50 % Glycerin
12,5 mM MgCl ₂	0,01 M EDTA pH 8,0	0,007 % Ammoniumpersulfat	
0,5 mM EDTA		0,1 % TEMED	
5 mM DTT			
15 % Ficoll			

4.2.2.7 Aufreinigung lipidbindender Protein mit Liposomen

4.2.2.7.1 Herstellung von biotinylierten Liposomen

Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml wurden präpariert. Hierfür wurden die Einzelbestandteile der Liposomen (s. Tabelle) zusammengemischt, in einer SpeedVac eingetrocknet und anschließend mit 500 µl Liposomenpuffer resuspendiert. Die Gesamtmenge der eingesetzten Lipide betrug 5 mg. Um die Bildung von Liposomen zu induzieren, wurde die Suspension auf Eis mit Ultraschall behandelt. Hierfür wurde ein „microtip sonicator“ im 10% Puls-Modus bei maximaler Leistung verwendet. Nach ca. 1 bis 2 Minuten zeigt das Eintrüben der Lösung die Bildung der Liposomen an. Diese wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zusammensetzung der Liposomen	Liposomenpuffer	Karbonatpuffer
60 % (70%) Phosphatidylcholin 20 % Phosphatidylinositol (10 % Cholesterin) 10 % biotinyliertes Phosphatidylethanolamine 2 % spezifisches Phosphoinositid (PI4P, PI3P, PI4,5P ₂)	50 mM Kaliumacetat 1 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,4	20 mM HEPES 50 mM KOAc 100 mM NaCO ₃ pH 11,5 1 mM DTT 1 mM PMSF 1 mM EDTA

4.2.2.7.2 Präparation peripherer Membranproteine

Um membrangebundene Protein anzureichern wurden zunächst Mikrosomen präpariert (s. 4.2.2.1.3). Diese wurden dann in einer 1:10 Verdünnung mit Karbonatpuffer behandelt. (200 µl Mikrosomen zum Beispiel wurden in einem 2 ml Ansatz behandelt). Pro Ansatz wurden zwischen 15 und 20 OD Mikrosomen eingesetzt. Die Karbonatextraktion erfolgte auf Eis für 30 Minuten, gefolgt von einem Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000 rpm für weitere 30 Minuten. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand über Nacht gegen den gleichen Puffer, allerdings ohne Karbonat dialysiert. Daraufhin wurde die Proteinlösung mit Centricon Filterröhrchen von Millipore aufkonzentriert und bei -20°C eingefroren.

4.2.2.7.3 Affinitätsaufreinigung mit botinylierten Liposomen

Reaktionsansatz
50 µl Liposomen
100 µl Proteinlösung
2 µl 1 M Natriumvanadat
48 µl Liposomenpuffer
+50 µl 50% Streptavidin-Agarose

Liposomen wurden mit der karbonatextrahierten Proteinlösung für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde eine 50% -Lösung Straptavidin-Agarose-Kügelchen zugegeben und die Reaktion für eine Stunden bei 4°C auf einem Dreher inkubiert. Die Kügelchen wurden danach drei Mal mit Liposomenpuffer gwaschen und mit 2X-SDS-Ladepuffer versetzt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot bzw. Anfärben mit Colloidal Blue.

4.2.2.8 Trypsinverdau von Proteinen für massenspektrometrische Analyse

Jedes ausgeschnittene Gelstück wurde für 20 Minuten unter starkem Schütteln (Vortex) in 100 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat in 30 % Methanol inkubiert. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt und das Gelstück in 100 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat in 50 % Acetonitril für weitere 20 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde für 10 Minuten in 100 µl 100% Acetonitril gewaschen. Daraufhin wurde das Gel mit Hilfe einer SpeedVac vollständig getrocknet. Nach Zugabe von 30 µl 10 mM DTT folgte ein dreissigminütiger Inkubationsschritt bei 35°C. Danach wurden 30 µl 55 mM Jodacetamid in Ammonium-bicarbonat zugegeben und im Dunkeln für 30 Minuten stark geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abpipettiert und 100 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat zugefügt. Es folgte ein weiterer zehnminütiger Schritt unter starkem Schütteln, danach Abpipettieren und Zugabe von 100 µl Acetonitril. Nach erneutem zehnminütigem Schütteln wurden die Gelstücke für 10 Minuten in der SpeedVac getrocknet. Anschließend wurde 7 µl einer Trypsinlösung (10 ng / µl 100 mM Ammoniumbicarbonat) zugegeben und das Gelstück für 16 Stunden bei 35°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen, jedes Gelstück zweimal mit 25 µl 1 % Formaldehyd gewaschen und die beiden Waschfraktionen zusammengeführt und bei 4°C aufbewahrt. Für die zweite Extraktion wurde höherkonzentrierte Formaldehydlösung verwendet die unter folgender Formel hergestellt wurde: Für x Gelstücke wurde x mal 30 µl 1 % Formaldehyd mit x µl reinem Formaldehyd gemischt. Von dieser Formldehydlösung wurde zu jedem Gelstück 30 µl pipettiert und dieses für 10 Minuten stark geschüttelt. Das Formaldehyd wurde abgenommen und in ein neues

Eppendorfgesäß überführt. Nun wurden 30 µl 1 % Formaldehyd zu jedem Gelstück zugegeben und erneut für 10 Minuten geschüttelt. Dieser Überstand wurde ebenfalls abpipettiert und mit der vorherigen 30 µl Fraktion zusammengeführt. Nach Trocknen in der SpeedVac wurden die Proben bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.2.9 Affinitätsreinigung DNA-bindender Proteine mit CNBr-aktivierter Sepharose

Um sequenzspezifische DNA-bindende Proteine aufzureinigen wurde eine Säulenaffinitätschromatographie mit CNBr-aktivierter Sepharose durchgeführt. Hierfür wurden komplementäre Oligodeoxynukleotide, die die Erkennungssequenz für das DNA-bindende Protein enthielten, hybridisiert, zu Oligomeren ligiert und kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. (nach Kadonaga et al, 1986)

1. Polymerisieren der Oligonukleotide

Zunächst musste die DNA für das Koppeln an die Sepharose vorbereitet werden. Hierfür wurden je 220 µg der komplementären Oligodeoxynukleotide gemischt, in einer SpeedVac getrocknet und in 75 µl Kinasepuffer aufgenommen. Es folgte ein Hybridisierungsschritt in dem die einzelsträngigen Oligodeoxynukleotide zu doppelsträngigen kombiniert wurden. Hierzu wurde die Mischung bei 88°C für 2 Minuten, bei 65°C für 10 Minuten, bei 37°C für 10 Minuten und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 15 µl 20 mM ATP und 10 µl T4-DNA-Kinase (100 units) von NEB zugegeben und die Phosphorylierung für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Danach wurden 150 µl Stopppuffer hinzupipettiert, für 15 Minuten bei 65°C inkubiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Nach Resuspension in 200 µl TE, 25 µl 100 mM MgCl₂, 25 µl 3 M NaOAc folgte eine erneute Fällung mit Ethanol. Die DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 75 µl Ligasepuffer resuspendiert. Es wurde 20 µl 20 mM ATP und 5 µl T4-DNA Ligase von NEB (2000 units) zugegeben und für 14 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die polymerisierten Oligomere mit Phenol extrahiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in 100 µl entionisiertem Wasser aufgenommen.

TemplateA-5: GGCAAGGGAAAAATACCCACAGGTTAGATAAGGAAATAG

TemplateA-3: CTATTCCTTATCTAAACCTGTGGTATTTTCCCTTGCC

Kinasepuffer	Stopp-Puffer	Ligasepuffer
1,3 X konzentrierter NEB Kinasepuffer 1.3 mM Spermidin	3,3 M NH ₄ OAC pH 5,5 16,7 mM MgCl ₂	1,3 X konzentrierter NEB Ligasepuffer 1.3 mM Spermidin

2. Koppeln der Oligonukleotide an CNBr-aktivierte Sepharose

Es wurde bereits aktivierte und in lyophilisierter Form vorliegende Sepharose 4B von GE Healthcare verwendet. Das Material musste zunächst gequollen und gewaschen werden. Alle folgenden Schritte sind analog zu den Angaben des Herstellers und zu Kadonaga et al., 1986.

3 g Sepharose wurden in 1 mM HCl in einem 50 ml Falconröhrchen zu einem Volumen von ca. 10 ml aufgequollen. Es folgten Waschschrte mit 300 ml eiskaltem entionisiertem Wasser und 100 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 8,0. Danach wurde die Sepharose in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 4 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 8,0 zugegeben. Zu dieser Mischung wurden die ligierten DNA-Oligomere hinzupipettiert und die Kopplungsreaktion unter vorsichtigem Mischen für 16 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach folgten Waschschrte mit 200 ml Wasser und 100 ml 1 M Ethanolamin pH 8,0. Das Material wurde anschließend in 1 M Ethanolamin in einem finalen Volumen von 14 ml resuspendiert. Um ungebundene reaktive Gruppen zu deaktivieren wurde für 5 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte mit 100 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 8,0, 100 ml 1 M Kaliumphosphat pH 8,0, 100 ml 1 M KCl, 100 ml Wasser, 100 ml 10 mM Tris-HCl-Storagebuffer (10 mM Tris HCl pH 7,6, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,02% NaN₃). In diesem Puffer kann das Sepharosematerial bei 4°C aufbewahrt werden.

3. Durchführen der Säulenchromatographie

Puffer Z
25 mM Hepes (K ⁺) pH 7,8 12,5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 20% Glycerin 0,1% NP-40

Alle beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. 1 ml des Sepharosesäulenmaterials wurde in eine „Econo“-Säule von BioRad gepackt und mit Puffer Z mit 0,1 M

KCl äquilibriert. Hefezelleextrakt aus 1 L Hefe (ca. 1 – 1,5 mg Protein) in Puffer Z mit 0,1 M KCl wurde mit 440 µg SS-DNA versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Das Protein-DNA-Gemisch wurde dann auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Die Säule wurde anschließend vier Mal mit je 2 ml Puffer Z mit 0,1 M KCl gewaschen. Dann wurde der Auslass der Säule geschlossen und 2 ml Puffer Z mit 0,5 M

KCl zum Säulenmaterial zugegeben. Mit Hilfe einer abgeschmolzenen Glaspipette wurde gründlich gemischt, für 10 Minuten inkubiert und anschließend eluiert. Dieser Schritt wurde mit 2 ml Puffer Z mit 1,0 M KCl wiederholt. Beide Eluate und die Durchlaufraktion wurden gegen 20 mM Hepes pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF über Nacht dialysiert und im Anschluß daran mit „Centricon“-Rührchen der Firma Milipore aufkonzentriert. Die Analyse erfolgte mittels „electrophoretic mobility shift assay“.

Alternativ wurden Aufreinigungsexperimente ohne Säule durchgeführt. In diesem Falle wurden 25 µl zuvor vier mal mit Proteinpuffer gewaschene Sepharosekügelchen mit 25 µl Proteinlösung (100 – 150 µg) in 25 µl Proteinpuffer unter An- oder Abwesenheit von freien kompetitiven doppelsträngigen Oligodeoxynukleotiden für 40 Minuten bei 4°C inkubiert. Diese wurden zuvor nach dem gleichen Protokoll wie oben beschrieben hybridisiert und in einem zehnfachen Überschuß zur Reaktion zugegeben. Anschließend wurden die Überstände abpipettiert und in neue Gefäße überführt. Die Sepharosekügelchen wurden vier mal mit Proteinpuffer gewaschen und zur Analyse mittels SDS-PAGE in 2X SDS Probenpuffer aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und bei Bedarf eingefroren. Um die freien kompetitiven Oligodeoxynukleotiden aus den Überständen zu entfernen, wurden diese kurz mit Dowex 1X8-200, einem Ionenaustauschmaterial, inkubiert und anschließend in neue Gefäße überführt. Das Dowex wurde zuvor mit Wasser gewaschen und pro Reaktion wurden 30 mg abgewogen. Die anschließende Analyse der Überstände erfolgte mittels EMSA. Hierfür wurden jeweils 1/10 des Reaktions-ansatzes eingesetzt.

4.2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Zellen, die GFP-markierte Proteine exprimieren, wurden über Nacht in einer 5 oder 10 ml Vorkultur bei 30°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur eine neue Kultur angeimpft und die Zellen wurden bei 30°C für 1-2 Teilungen weiter inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Vorkultur immer so angesetzt wurde, dass die Zelldichte von 1,5 OD₆₀₀ nicht überschritten wird. Zum Betrachten der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde teilweise die Kultur direkt unter dem Mikroskop betrachtet, teilweise mussten die Hefezellen noch aufkonzentriert werden. Dazu wurde 1 ml der Kultur entnommen, kurz pelletiert und in 50-100 μ l Medium aufgenommen. Als Mikroskop diente ein Diavert-Mikroskop von Leitz und ein BX60 Fluoreszenz-Mikroskop von Olympus mit einem Zeiss UPlanAPO 100x Ölimmersionsobjektiv. Die Bilder wurden mit einer Hamamatsu C4742-95 CCD Kamera und dem Programm „Openlab“ von Improvision (Heidelberg, Deutschland) aufgenommen.

5 Literaturverzeichnis

- Aasland, R., T.J. Gibson, and A.F. Stewart. 1995. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 20:56-9.
- Alani, E., R. Thresher, J.D. Griffith, and R.D. Kolodner. 1992. Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol.* 227:54-71.
- Ambroziak, J., and S.A. Henry. 1994. INO2 and INO4 gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the INO1 promoter. *J Biol Chem.* 269:15344-9.
- Ashburner, B.P., and J.M. Lopes. 1995. Autoregulated expression of the yeast INO2 and INO4 helix-loop-helix activator genes effects cooperative regulation on their target genes. *Mol Cell Biol.* 15:1709-15.
- Audhya, A., and S.D. Emr. 2003. Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *Embo J.* 22:4223-36.
- Balla, T. 1998. Phosphatidylinositol 4-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1436:69-85.
- Balla, T. 2005. Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci.* 118:2093-104.
- Belotserkovskaya, R., and S.L. Berger. 1999. Interplay between chromatin modifying and remodeling complexes in transcriptional regulation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 9:221-30.
- Bensen, E.S., G. Costaguta, and G.S. Payne. 2000. Synthetic genetic interactions with temperature-sensitive clathrin in *Saccharomyces cerevisiae*. Roles for synaptojanin-like Inp53p and dynamin-related Vps1p in clathrin-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Genetics.* 154:83-97.
- Berger, S.L., W.D. Cress, A. Cress, S.J. Triezenberg, and L. Guarente. 1990. Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell.* 61:1199-208.
- Berridge, M.J. 1993. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* 365:388-9.
- Blackwood, E.M., and J.T. Kadonaga. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science.* 281:60-3.
- Bonangelino, C.J., N.L. Catlett, and L.S. Weisman. 1997. Vac7p, a novel vacuolar protein, is required for normal vacuole inheritance and morphology. *Mol Cell Biol.* 17:6847-58.

- Bonangelino, C.J., J.J. Nau, J.E. Duex, M. Brinkman, A.E. Wurmser, J.D. Gary, S.D. Emr, and L.S. Weisman. 2002. Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J Cell Biol.* 156:1015-28.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-66.
- Boronenkov, I.V., J.C. Loijens, M. Umeda, and R.A. Anderson. 1998. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell.* 9:3547-60.
- Boyd, K.E., and P.J. Farnham. 1999. Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol.* 19:8393-9.
- Brand, A.H., L. Breeden, J. Abraham, R. Sternglanz, and K. Nasmyth. 1985. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell.* 41:41-8.
- Brennan, R.G., and B.W. Matthews. 1989. The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem.* 264:1903-6.
- Bunce, M.W., K. Bergendahl, and R.A. Anderson. 2006. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal. *Biochim Biophys Acta.* 1761:560-9.
- Burd, C.G., and S.D. Emr. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell.* 2:157-62.
- Burke, T.W., and J.T. Kadonaga. 1996. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10:711-24.
- Butler, J.E., and J.T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16:2583-92.
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 296:1655-7.
- Carman, G.M., and S.A. Henry. 1989. Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annu Rev Biochem.* 58:635-69.
- Carman, G.M., and S.A. Henry. 1999. Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Prog Lipid Res.* 38:361-99.
- Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell.* 103:263-71.
- Ciruela, A., K.A. Hinchliffe, N. Divecha, and R.F. Irvine. 2000. Nuclear targeting of the

- beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7. *Biochem J.* 346 Pt 3:587-91.
- Clague, M.J., and O. Lorenzo. 2005. The myotubularin family of lipid phosphatases. *Traffic.* 6:1063-9.
- Cleves, A.E., P.J. Novick, and V.A. Bankaitis. 1989. Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J Cell Biol.* 109:2939-50.
- Cockcroft, S., and M.A. De Matteis. 2001. Inositol lipids as spatial regulators of membrane traffic. *J Membr Biol.* 180:187-94.
- Cooke, F.T., S.K. Dove, R.K. McEwen, G. Painter, A.B. Holmes, M.N. Hall, R.H. Michell, and P.J. Parker. 1998. The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. *Curr Biol.* 8:1219-22.
- Cozier, G.E., J. Carlton, D. Bouyoucef, and P.J. Cullen. 2004. Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 282:49-88.
- Cremona, O., and P. De Camilli. 2001. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci.* 114:1041-52.
- Das, S., J.E. Dixon, and W. Cho. 2003. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7491-6.
- Davis, R.L., P.F. Cheng, A.B. Lassar, and H. Weintraub. 1990. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell.* 60:733-46.
- De Matteis, M.A., A. Di Campli, and A. Godi. 2005. The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta.* 1744:396-405.
- De Matteis, M.A., and A. Godi. 2004. PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol.* 6:487-92.
- DiNitto, J.P., T.C. Cronin, and D.G. Lambright. 2003. Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE.* 2003:re16.
- Dove, S.K., R.K. McEwen, A. Mayes, D.C. Hughes, J.D. Beggs, and R.H. Michell. 2002. Vac14 controls PtdIns(3,5)P(2) synthesis and Fab1-dependent protein trafficking to the multivesicular body. *Curr Biol.* 12:885-93.
- Duex, J.E., F. Tang, and L.S. Weisman. 2006. The Vac14p-Fig4p complex acts independently of Vac7p and couples PI3,5P2 synthesis and turnover. *J Cell Biol.* 172:693-704.

- Dynan, W.S. 1989. Modularity in promoters and enhancers. *Cell*. 58:1-4.
- Dynan, W.S., and R. Tjian. 1985. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*. 316:774-8.
- Dynlacht, B.D., T. Hoey, and R. Tjian. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*. 66:563-76.
- Erdman, S., L. Lin, M. Malczynski, and M. Snyder. 1998. Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol*. 140:461-83.
- Evans, R.M., and S.M. Hollenberg. 1988. Zinc fingers: gilt by association. *Cell*. 52:1-3.
- Fanning, E., V. Klimovich, and A.R. Nager. 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res*. 34:4126-37.
- Faulhammer, F., G. Konrad, B. Brankatschk, S. Tahirovic, A. Knodler, and P. Mayinger. 2005. Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between Sac1p and Dpm1p. *J Cell Biol*. 168:185-91.
- Feng, X., Y. Hara, and K. Riabowol. 2002. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol*. 12:532-8.
- Feng, Y., S.R. Wentz, and P.W. Majerus. 2001. Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:875-9.
- FitzGerald, P.C., A. Shlyakhtenko, A.A. Mir, and C. Vinson. 2004. Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res*. 14:1562-74.
- Foti, M., A. Audhya, and S.D. Emr. 2001. Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol Biol Cell*. 12:2396-411.
- Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 67:481-507.
- Gary, J.D., A.E. Wurmser, C.J. Bonangelino, L.S. Weisman, and S.D. Emr. 1998. Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol*. 143:65-79.
- Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.A. Heurtier, R.R. Copley, A. Edlmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P.

- Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141-7.
- Gehrmann, T., and L.M. Heilmeyer, Jr. 1998. Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem*. 253:357-70.
- Gietz, R.D., and A. Sugino. 1988. New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*. 74:527-34.
- Gillooly, D.J., I.C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N.J. Bryant, J.M. Gaullier, R.G. Parton, and H. Stenmark. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J*. 19:4577-88.
- Godi, A., A. Di Campli, A. Konstantakopoulos, G. Di Tullio, D.R. Alessi, G.S. Kular, T. Daniele, P. Marra, J.M. Lucocq, and M.A. De Matteis. 2004. FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol*. 6:393-404.
- Godi, A., P. Pertile, R. Meyers, P. Marra, G. Di Tullio, C. Iurisci, A. Luini, D. Corda, and M.A. De Matteis. 1999. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol*. 1:280-7.
- Gozani, O., P. Karuman, D.R. Jones, D. Ivanov, J. Cha, A.A. Lugovskoy, C.L. Baird, H. Zhu, S.J. Field, S.L. Lessnick, J. Villasenor, B. Mehrotra, J. Chen, V.R. Rao, J.S. Brugge, C.G. Ferguson, B. Payrastra, D.G. Myszka, L.C. Cantley, G. Wagner, N. Divecha, G.D. Prestwich, and J. Yuan. 2003. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*. 114:99-111.
- Greenberg, M.L., and J.M. Lopes. 1996. Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 60:1-20.
- Greenberg, M.L., B. Reiner, and S.A. Henry. 1982. Regulatory mutations of inositol biosynthesis in yeast: isolation of inositol-excreting mutants. *Genetics*. 100:19-33.
- Grosschedl, R., and M.L. Birnstiel. 1980. Spacer DNA sequences upstream of the T-A-T-A-A-A-T-A sequence are essential for promotion of H2A histone gene transcription in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:7102-6.
- Guo, S., L.E. Stolz, S.M. Lemrow, and J.D. York. 1999. SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem*. 274:12990-5.
- Ha, S.A., J.T. Bunch, H. Hama, D.B. DeWald, and S.F. Nothwehr. 2001. A novel mechanism for localizing membrane proteins to yeast trans-Golgi network

- requires function of synaptojanin-like protein. *Mol Biol Cell*. 12:3175-90.
- Hama, H., E.A. Schnieders, J. Thorner, J.Y. Takemoto, and D.B. DeWald. 1999. Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274:34294-300.
- Han, G.S., A. Audhya, D.J. Markley, S.D. Emr, and G.M. Carman. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* LSB6 gene encodes phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J Biol Chem*. 277:47709-18.
- Hanakahi, L.A., M. Bartlett-Jones, C. Chappell, D. Pappin, and S.C. West. 2000. Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell*. 102:721-9.
- Henry, S.A., and J.L. Patton-Vogt. 1998. Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 61:133-79.
- Herscovics, A., and P. Orlean. 1993. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *Faseb J*. 7:540-50.
- Heyken, W.T., A. Repenning, J. Kumme, and H.J. Schuller. 2005. Constitutive expression of yeast phospholipid biosynthetic genes by variants of Ino2 activator defective for interaction with Opi1 repressor. *Mol Microbiol*. 56:696-707.
- Heyken, W.T., C. Wagner, J. Wittmann, A. Albrecht, and H.J. Schuller. 2003. Negative regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by a *Candida albicans* orthologue of OPI1. *Yeast*. 20:1177-88.
- Heymont, J., L. Berenfeld, J. Collins, A. Kaganovich, B. Maynes, A. Moulin, I. Ratskovskaya, P.P. Poon, G.C. Johnston, M. Kamenetsky, J. DeSilva, H. Sun, G.A. Petsko, and J. Engebrecht. 2000. TEP1, the yeast homolog of the human tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1, is linked to the phosphatidylinositol pathway and plays a role in the developmental process of sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12672-7.
- Hokin, L.E. 1985. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annu Rev Biochem*. 54:205-35.
- Homma, K., S. Terui, M. Minemura, H. Qadota, Y. Anraku, Y. Kanaho, and Y. Ohya. 1998. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem*. 273:15779-86.
- Hori, R., and M. Carey. 1994. The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Curr Opin Genet Dev*. 4:236-44.
- Huang, K.N., and L.S. Symington. 1995. Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene PTC1 and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics*. 141:1275-85.

- Huang, S., and D.L. Spector. 1996. Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biochem.* 62:191-7.
- Hughes, W.E., F.T. Cooke, and P.J. Parker. 2000a. Sac phosphatase domain proteins. *Biochem J.* 350 Pt 2:337-52.
- Hughes, W.E., M.J. Pocklington, E. Orr, and C.J. Paddon. 1999. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* gene SAC1 cause multiple drug sensitivity. *Yeast.* 15:1111-24.
- Hughes, W.E., R. Woscholski, F.T. Cooke, R.S. Patrick, S.K. Dove, N.Q. McDonald, and P.J. Parker. 2000b. SAC1 encodes a regulated lipid phosphoinositide phosphatase, defects in which can be suppressed by the homologous Inp52p and Inp53p phosphatases. *J Biol Chem.* 275:801-8.
- Hurley, J.H., and T. Meyer. 2001. Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol.* 13:146-52.
- Jackson, S.P., J.J. MacDonald, S. Lees-Miller, and R. Tjian. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell.* 63:155-65.
- Jesch, S.A., X. Zhao, M.T. Wells, and S.A. Henry. 2005. Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J Biol Chem.* 280:9106-18.
- Jiranek, V., J.A. Graves, and S.A. Henry. 1998. Pleiotropic effects of the opi1 regulatory mutation of yeast: its effects on growth and on phospholipid and inositol metabolism. *Microbiology.* 144 (Pt 10):2739-48.
- Johnson, P.F., and S.L. McKnight. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem.* 58:799-839.
- Kaadige, M.R., and J.M. Lopes. 2006. Analysis of Opi1p repressor mutants. *Curr Genet.* 49:30-8.
- Kadonaga, J.T., and R. Tjian. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5889-93.
- Kingston, R.E., and G.J. Narlikar. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13:2339-52.
- Kochendorfer, K.U., A.R. Then, B.G. Kearns, V.A. Bankaitis, and P. Mayinger. 1999. Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *Embo J.* 18:1506-15.
- Konrad, G., T. Schlecker, F. Faulhammer, and P. Mayinger. 2002. Retention of the yeast Sac1p phosphatase in the endoplasmic reticulum causes distinct changes in

- cellular phosphoinositide levels and stimulates microsomal ATP transport. *J Biol Chem.* 277:10547-54.
- Kornberg, R.D. 1996. RNA polymerase II transcription control. *Trends Biochem Sci.* 21:325-6.
- Kornberg, R.D., and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 98:285-94.
- Kowalczykowski, S.C. 2000. Some assembly required. *Nat Struct Biol.* 7:1087-9.
- Krajewska, W.M. 1992. Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem.* 24:1885-98.
- Krugmann, S., K.E. Anderson, S.H. Ridley, N. Risso, A. McGregor, J. Coadwell, K. Davidson, A. Eguinoa, C.D. Ellson, P. Lipp, M. Manifava, N. Ktistakis, G. Painter, J.W. Thuring, M.A. Cooper, Z.Y. Lim, A.B. Holmes, S.K. Dove, R.H. Mitchell, A. Grewal, A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 2002. Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Mol Cell.* 9:95-108.
- Leber, A., C. Hrastnik, and G. Daum. 1995. Phospholipid-synthesizing enzymes in Golgi membranes of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 377:271-4.
- Lemmon, M.A. 2003. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic.* 4:201-13.
- Leslie, N.R., R.M. Biondi, and D.R. Alessi. 2001. Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem Rev.* 101:2365-80.
- Lewin, B. 1990. Commitment and activation at pol II promoters: a tail of protein-protein interactions. *Cell.* 61:1161-4.
- Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S.I. Wang, J. Puc, C. Miliaresis, L. Rodgers, R. McCombie, S.H. Bigner, B.C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M.H. Wigler, and R. Parsons. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 275:1943-7.
- Lin, Y.S., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg, and M.R. Green. 1991. Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature.* 353:569-71.
- Loewen, C.J., M.L. Gaspar, S.A. Jesch, C. Delon, N.T. Ktistakis, S.A. Henry, and T.P. Levine. 2004. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science.* 304:1644-7.
- Loewen, C.J., and T.P. Levine. 2005. A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of

- lipid-binding proteins. *J Biol Chem.* 280:14097-104.
- Loewen, C.J., A. Roy, and T.P. Levine. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *Embo J.* 22:2025-35.
- Longhese, M.P., P. Plevani, and G. Lucchini. 1994. Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol.* 14:7884-90.
- Lopes, J.M., and S.A. Henry. 1991. Interaction of trans and cis regulatory elements in the INO1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 19:3987-94.
- Luo, H.R., A. Saiardi, H. Yu, E. Nagata, K. Ye, and S.H. Snyder. 2002. Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase c1 mutant yeast. *Biochemistry.* 41:2509-15.
- Macbeth, M.R., H.L. Schubert, A.P. Vandemark, A.T. Lingam, C.P. Hill, and B.L. Bass. 2005. Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science.* 309:1534-9.
- Macia, E., S. Paris, and M. Chabre. 2000. Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids. *Biochemistry.* 39:5893-901.
- Maehama, T., and J.E. Dixon. 1999. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* 9:125-8.
- Maldonado, E., M. Hampsey, and D. Reinberg. 1999. Repression: targeting the heart of the matter. *Cell.* 99:455-8.
- Maniatis, T., S. Goodbourn, and J.A. Fischer. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science.* 236:1237-45.
- Martin, T.F. 1997. Phosphoinositides as spatial regulators of membrane traffic. *Curr Opin Neurobiol.* 7:331-8.
- Mayinger, P., V.A. Bankaitis, and D.I. Meyer. 1995. Sac1p mediates the adenosine triphosphate transport into yeast endoplasmic reticulum that is required for protein translocation. *J Cell Biol.* 131:1377-86.
- McKnight, S., and R. Tjian. 1986. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell.* 46:795-805.
- McPherson, P.S., E.P. Garcia, V.I. Slepnev, C. David, X. Zhang, D. Grabs, W.S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto, and P. De Camilli. 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature.* 379:353-7.
- Miller, A.L., M. Suntharalingam, S.L. Johnson, A. Audhya, S.D. Emr, and S.R. Wentz. 2004. Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for

- mediating the Gle1-mRNA export pathway. *J Biol Chem.* 279:51022-32.
- Minogue, S., M.G. Waugh, M.A. De Matteis, D.J. Stephens, F. Berditchevski, and J.J. Hsuan. 2006. Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor. *J Cell Sci.* 119:571-81.
- Murre, C., P.S. McCaw, and D. Baltimore. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 56:777-83.
- Nemoto, Y., B.G. Kearns, M.R. Wenk, H. Chen, K. Mori, J.G. Alb, Jr., P. De Camilli, and V.A. Bankaitis. 2000. Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity. *J Biol Chem.* 275:34293-305.
- Nikawa, J., and S. Yamashita. 1997. Phosphatidylinositol synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1348:173-8.
- Nikoloff, D.M., and S.A. Henry. 1994. Functional characterization of the INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. A positive regulator of phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem.* 269:7402-11.
- Novick, P., B.C. Osmond, and D. Botstein. 1989. Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics.* 121:659-74.
- Odom, A.R., A. Stahlberg, S.R. Wentz, and J.D. York. 2000. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science.* 287:2026-9.
- Orlean, P. 1990. Dolichol phosphate mannosyl transferase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 10:5796-805.
- Osborne, S.L., C.L. Thomas, S. Gschmeissner, and G. Schiavo. 2001. Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci.* 114:2501-11.
- Pabo, C.O., and R.T. Sauer. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* 61:1053-95.
- Parraga, G., S.J. Horvath, A. Eisen, W.E. Taylor, L. Hood, E.T. Young, and R.E. Klevit. 1988. Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science.* 241:1489-92.
- Patki, V., D.C. Lawe, S. Corvera, J.V. Virbasius, and A. Chawla. 1998. A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature.* 394:433-4.
- Payraastre, B., M. Nievers, J. Boonstra, M. Breton, A.J. Verkleij, and P.M. Van Bergen en Henegouwen. 1992. A differential location of phosphoinositide kinases,

- diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem.* 267:5078-84.
- Pendaries, C., H. Tronchere, M. Plantavid, and B. Payrastre. 2003. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett.* 546:25-31.
- Pombo, A., and P.R. Cook. 1996. The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp Cell Res.* 229:201-3.
- Pugh, B.F., and R. Tjian. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell.* 61:1187-97.
- Rando, O.J., K. Zhao, P. Janmey, and G.R. Crabtree. 2002. Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2824-9.
- Rao, V.R., M.N. Corradetti, J. Chen, J. Peng, J. Yuan, G.D. Prestwich, and J.S. Brugge. 1999. Expression cloning of protein targets for 3-phosphorylated phosphoinositides. *J Biol Chem.* 274:37893-900.
- Ringstad, N., Y. Nemoto, and P. De Camilli. 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8569-74.
- Rizo, J., and T.C. Sudhof. 1998. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem.* 273:15879-82.
- Roeder, R.G. 1991. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci.* 16:402-8.
- Roeder, R.G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* 21:327-35.
- Rohde, H.M., F.Y. Cheong, G. Konrad, K. Paiha, P. Mayinger, and G. Boehmelt. 2003. The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatamer I complex. *J Biol Chem.* 278:52689-99.
- Romero, C., P. Desai, N. DeLillo, and A. Vancura. 2006. Expression of FLR1 transporter requires phospholipase C and is repressed by Mediator. *J Biol Chem.* 281:5677-85.
- Roos, J., and R.B. Kelly. 1998. Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain-containing protein that interacts with *Drosophila* dynamin. *J Biol Chem.* 273:19108-19.
- Roth, M.G. 2004. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev.* 84:699-730.

- Rudge, S.A., D.M. Anderson, and S.D. Emr. 2004. Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P₂ levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P₂-specific phosphatase. *Mol Biol Cell*. 15:24-36.
- Saiardi, A., A.C. Resnick, A.M. Snowman, B. Wendland, and S.H. Snyder. 2005. Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:1911-4.
- Saltzman, A.G., and R. Weinmann. 1989. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *Faseb J*. 3:1723-33.
- Santiago, T.C., and C.B. Mamoun. 2003. Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *J Biol Chem*. 278:38723-30.
- Saxena, A., P. Morozov, D. Frank, R. Musalo, M.A. Lemmon, E.Y. Skolnik, and B. Tycko. 2002. Phosphoinositide binding by the pleckstrin homology domains of Ipl and Tih1. *J Biol Chem*. 277:49935-44.
- Scarpulla, R.C. 2002. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*. 286:81-9.
- Schiavo, G., Q.M. Gu, G.D. Prestwich, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 1996. Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13327-32.
- Schleif, R. 1988. DNA binding by proteins. *Science*. 241:1182-7.
- Schorr, M., A. Then, S. Tahirovic, N. Hug, and P. Mayinger. 2001. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol*. 11:1421-6.
- Shelton, S.N., B. Barylko, D.D. Binns, B.F. Horazdovsky, J.P. Albanesi, and J.M. Goodman. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* contains a Type II phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J*. 371:533-40.
- Shen, X., H. Xiao, R. Ranallo, W.H. Wu, and C. Wu. 2003. Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science*. 299:112-4.
- Shore, D., and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*. 51:721-32.
- Simonsen, A., A.E. Wurmser, S.D. Emr, and H. Stenmark. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*. 13:485-92.
- Slepnev, V.I., G.C. Ochoa, M.H. Butler, and P. De Camilli. 2000. Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of

- clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem.* 275:17583-9.
- Sorger, P.K., M.J. Lewis, and H.R. Pelham. 1987. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature.* 329:81-4.
- Sreenivas, A., and G.M. Carman. 2003. Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase A. *J Biol Chem.* 278:20673-80.
- Sreenivas, A., M.J. Villa-Garcia, S.A. Henry, and G.M. Carman. 2001. Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase C. *J Biol Chem.* 276:29915-23.
- Stack, J.H., D.B. DeWald, K. Takegawa, and S.D. Emr. 1995. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol.* 129:321-34.
- Stack, J.H., P.K. Herman, P.V. Schu, and S.D. Emr. 1993. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo J.* 12:2195-204.
- Steck, P.A., M.A. Pershouse, S.A. Jasser, W.K. Yung, H. Lin, A.H. Ligon, L.A. Langford, M.L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D.H. Teng, and S.V. Tavtigian. 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 15:356-62.
- Stefan, C.J., A. Audhya, and S.D. Emr. 2002. The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell.* 13:542-57.
- Steger, D.J., E.S. Haswell, A.L. Miller, S.R. Wentz, and E.K. O'Shea. 2003. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science.* 299:114-6.
- Stolz, L.E., C.V. Huynh, J. Thorner, and J.D. York. 1998. Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (INP51, INP52 and INP53 gene products) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 148:1715-29.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41-5.
- Struhl, K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu Rev Biochem.* 58:1051-77.

- Struhl, K. 1995. Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu Rev Genet.* 29:651-74.
- Struhl, K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* 98:1-4.
- Suzuki, Y., T. Tsunoda, J. Sese, H. Taira, J. Mizushima-Sugano, H. Hata, T. Ota, T. Isogai, T. Tanaka, Y. Nakamura, A. Suyama, Y. Sakaki, S. Morishita, K. Okubo, and S. Sugano. 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res.* 11:677-84.
- Sweet, T.J., B. Boyer, W. Hu, K.E. Baker, and J. Collier. 2007. Microtubule disruption stimulates P-body formation. *Rna.*
- Tahirovic, S., M. Schorr, and P. Mayinger. 2005. Regulation of intracellular phosphatidylinositol-4-phosphate by the Sac1 lipid phosphatase. *Traffic.* 6:116-30.
- Toker, A. 2002. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 59:761-79.
- Tolias, K.F., and L.C. Cantley. 1999. Pathways for phosphoinositide synthesis. *Chem Phys Lipids.* 98:69-77.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 101:249-58.
- VanDemark, A.P., M. Blanksma, E. Ferris, A. Heroux, C.P. Hill, and T. Formosa. 2006. The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition. *Mol Cell.* 22:363-74.
- Vinson, C.R., P.B. Sigler, and S.L. McKnight. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science.* 246:911-6.
- Voss, D., and O. Pongs. 1986. Upstream sequences modulate in vitro transcription from Drosophila yolk protein genes I and II. *Eur J Biochem.* 158:25-32.
- Wade, P.A., and A.P. Wolffe. 1999. Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr Biol.* 9:R221-4.
- Wagner, C., M. Blank, B. Strohmann, and H.J. Schuller. 1999. Overproduction of the Opi1 repressor inhibits transcriptional activation of structural genes required for phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:843-54.
- Wagner, C., M. Dietz, J. Wittmann, A. Albrecht, and H.J. Schuller. 2001. The negative regulator Opi1 of phospholipid biosynthesis in yeast contacts the pleiotropic

- repressor Sin3 and the transcriptional activator Ino2. *Mol Microbiol.* 41:155-66.
- Wang, Y.J., J. Wang, H.Q. Sun, M. Martinez, Y.X. Sun, E. Macia, T. Kirchhausen, J.P. Albanesi, M.G. Roth, and H.L. Yin. 2003. Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell.* 114:299-310.
- Wei, H.C., J. Sanny, H. Shu, D.L. Baillie, J.A. Brill, J.V. Price, and N. Harden. 2003. The Sac1 lipid phosphatase regulates cell shape change and the JNK cascade during dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol.* 13:1882-7.
- Wei, Y.J., H.Q. Sun, M. Yamamoto, P. Wlodarski, K. Kunii, M. Martinez, B. Barylko, J.P. Albanesi, and H.L. Yin. 2002. Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J Biol Chem.* 277:46586-93.
- Weinzierl, R.O., B.D. Dynlacht, and R. Tjian. 1993. Largest subunit of *Drosophila* transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature.* 362:511-7.
- Wenk, M.R., and P. De Camilli. 2004. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8262-9.
- Whatmore, J., C. Wiedemann, P. Somerharju, P. Swigart, and S. Cockcroft. 1999. Resynthesis of phosphatidylinositol in permeabilized neutrophils following phospholipase C β activation: transport of the intermediate, phosphatidic acid, from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum for phosphatidylinositol resynthesis is not dependent on soluble lipid carriers or vesicular transport. *Biochem J.* 341 (Pt 2):435-44.
- Whisstock, J.C., F. Wiradjaja, J.E. Waters, and R. Gurung. 2002. The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life.* 53:15-23.
- White, M.J., J.P. Hirsch, and S.A. Henry. 1991. The OPI1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a negative regulator of phospholipid biosynthesis, encodes a protein containing polyglutamine tracts and a leucine zipper. *J Biol Chem.* 266:863-72.
- Whitters, E.A., A.E. Cleves, T.P. McGee, H.B. Skinner, and V.A. Bankaitis. 1993. SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. *J Cell Biol.* 122:79-94.
- Wingender, E. 1988. Compilation of transcription regulating proteins. *Nucleic Acids Res.* 16:1879-902.
- Wong, K., R. Meyers dd, and L.C. Cantley. 1997. Subcellular locations of

- phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *J Biol Chem.* 272:13236-41.
- Woscholski, R., P.M. Finan, E. Radley, N.F. Totty, A.E. Sterling, J.J. Hsuan, M.D. Waterfield, and P.J. Parker. 1997. Synaptojanin is the major constitutively active phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase in rodent brain. *J Biol Chem.* 272:9625-8.
- Yamamoto, A., D.B. DeWald, I.V. Boronenkov, R.A. Anderson, S.D. Emr, and D. Koshland. 1995. Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell.* 6:525-39.
- York, J.D. 2006. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta.* 1761:552-9.
- York, J.D., A.R. Odom, R. Murphy, E.B. Ives, and S.R. Wentz. 1999. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science.* 285:96-100.
- York, S.J., B.N. Armbruster, P. Greenwell, T.D. Petes, and J.D. York. 2005. Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J Biol Chem.* 280:4264-9.
- Yu, H., K. Fukami, Y. Watanabe, C. Ozaki, and T. Takenawa. 1998. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur J Biochem.* 251:281-7.
- Yu, J.W., J.M. Mendrola, A. Audhya, S. Singh, D. Keleti, D.B. DeWald, D. Murray, S.D. Emr, and M.A. Lemmon. 2004. Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 13:677-88.
- Yuzhakov, A., Z. Kelman, J. Hurwitz, and M. O'Donnell. 1999. Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *Embo J.* 18:6189-99.
- Zhao, K., W. Wang, O.J. Rando, Y. Xue, K. Swiderek, A. Kuo, and G.R. Crabtree. 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell.* 95:625-36.
- Zhong, R., D.H. Burk, C.J. Nairn, A. Wood-Jones, W.H. Morrison, 3rd, and Z.H. Ye. 2005. Mutation of SAC1, an Arabidopsis SAC domain phosphoinositide phosphatase, causes alterations in cell morphogenesis, cell wall synthesis, and actin organization. *Plant Cell.* 17:1449-66.

Abkürzungen

□	anti, gegen
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ARS	autonom replizierendes Fragment
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CEN	centromeres Segment
DAG	Diacylglycerol
Da	Dalton
□	Deletion, Knock-out, Delta
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	“early endosomal autoantigen”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENTH	“epsin N-terminal homologue”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAPP1	“phosphatidylinositol-four-phosphate adaptor protein 1”
FYVE	Fab1, YOTB, Vac1, EEA1
g	Gramm
Gal	Galaktose
GFP	“green fluorescent protein“
h	Stunde
HC	“Hardwell«s complete media”, selektives Medium
HCl	Hydrochlorid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure
HPLC	“high performance liquid chromatography”
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertrani
LiOAc	Lithiumacetat
KOAc	Kaliumacetat
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
□Ci	Mikrocurie
□g	Mikrogramm
□l	Mikroliter
□M	Mikromolar

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
NT	Nucleotid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	“ <i>phosphate buffer saline</i> ” = Phosphat-gepufferte Salzsäure
PCR	“ <i>polymerase chain reaction</i> ”, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PH	“ <i>pleckstrin homology</i> ”
PK	Proteinkinase
PM	Plasmamembran
pmol	pikomol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol(3)phosphat
PtdIns(4)P	Phosphatidylinositol(4)phosphat
PtdIns(5)P	Phosphatidylinositol(5)phosphat
PtdIns(3,4)P₂	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PtdIns(4,5)P₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
PtdIns(3,5)P₂	Phosphatidylinositol(3,5)bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
PX	“ <i>pleckstrin homology</i> ”
Rpm	“ <i>rounds per minute</i> ”, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAC	“ <i>suppressor of actin mutants</i> ”
SDS	“ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ” = Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TCA	2,2,2-Trichloressigsäure
TEMED	,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tryp	Trypsin
ts	temperatursensitiv
TX-100	Triton-X-100
ÿN	über Nacht
ÿNK	Übernachtskultur
Unit	Einheit für die Enzymaktivität
V	Volt
WT	Wildtyp
YEP	„ <i>yeast extract peptone</i> “
YNB	„ <i>yeast nitrogen base</i> “
YPD	„ <i>yeast peptone dextrose</i> “