

**"Untersuchungen zur Funktion und Struktur
des Proteins Gal1p der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*"**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Carsten Amuel

aus Ratingen

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. C.P. Hollenberg

Korreferent: Prof. Dr. U. Heinlein

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2003

*Jedes Ding hat drei Seiten:
Eine, die Du siehst,
eine, die ich sehe
und eine, die wir
beide nicht sehen.*

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Galaktose-Metabolismus der Hefen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Kluyveromyces lactis</i> als Modellsystem für die Genregulation	2
1.2 Die Regulation der <i>MEL/GAL</i> -Gene in <i>S. cerevisiae</i>	3
1.3 Die Regulation der <i>LAC/GAL</i> -Gene in <i>K. lactis</i>	5
1.4 Gal4, der Transkriptionsaktivator der <i>GAL</i> -Gene	5
1.5 Gal80, der Transkriptionsrepressor der <i>GAL</i> -Gene	7
1.6 Gal1, ein bifunktionelles Protein des <i>LAC/GAL</i> -Regulons	8
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Chemikalien, Enzyme und Antikörper	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Enzyme	11
2.1.3 Antikörper.....	11
2.2 Stämme und Medien	12
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	12
2.2.2 Medien, Anzucht und Lagerung von Bakterienstämmen.....	12
2.2.3 <i>Kluyveromyces lactis</i>	12
2.2.4 <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	12
2.2.5 Medien, Anzucht und Lagerung von Hefestämmen	13
2.3 Plasmide.....	13
2.3.1 Ausgangsplasmide	13
2.3.2 Plasmidkonstruktionen	15
2.4 Oligonukleotide	16
2.5 Transformation	17
2.5.1 Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.5.2 Transformation von Hefen.....	17
2.6 Präparation von Nukleinsäuren	18
2.6.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.6.1.1 Mini-Präparation.....	18
2.6.1.2 Midi-Präparation.....	18
2.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe	18
2.6.3 Präparation von genomischer DNA aus Hefe.....	18
2.7 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	19
2.7.1 Bestimmung der Konzentration mittels Spektralphotometrie.....	19
2.7.2 DNA-Konzentrationsabschätzung aus Agarosegelen	19

2.8	Enzymatische Modifikation von DNA.....	19
2.8.1	Restriktion von DNA.....	19
2.8.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	19
2.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	19
2.8.4	DNA-Sequenzierung	19
2.8.5	Auffüllung von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment	20
2.8.6	T4-Polymerase Reaktion	20
2.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten (elektroph.)	20
2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.10.1	Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA	20
2.10.2	Zellkolonie-PCR für den Integrationsnachweis	20
2.10.3	„random-PCR-Mutagenese“ (zufallsgerichtet)	21
2.11	Herstellung von Zellextrakten	21
2.11.1	Herstellung von analytischen Proteinextrakten mittels Glasperlen	21
2.11.2	Herstellung von analytischen Proteinextrakten aus <i>E. coli</i>	21
2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976)	22
2.13	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	22
2.13.1	β -Galaktosidase Enzymtest mit Flüssigkulturen	22
2.13.2	β -Galaktosidase-Enzymtest durch X-Gal-Überschichtungstest	22
2.13.3	X-Gal-Filtertest zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität.....	23
2.13.4	Bestimmung der Galaktokinase-Enzymaktivität (nicht radioaktiv)	23
2.14	Dephosphorylierung von Proteinen.....	24
2.15	Auftrennung und Nachweis von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.15.1	Coomassie-Färbung.....	24
2.15.2	Silber-Färbung.....	24
2.16	Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine („Western-Analyse“).....	25
2.16.1	Elektroblot.....	25
2.16.2	Detektion der filtergebundenen Proteine.....	25
2.16.3	Entfernung von Antikörpern an filtergebundenen Proteinen.....	25
2.17	„Southern-Analyse“ von genomischer DNA.....	25
2.18	Immunfluoreszenz-Analyse.....	26
2.19	Anfärbung der DNA mit DAPI (4,6- Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid).....	26
2.20	Affinitätschromatographie-Systeme.....	27
2.20.1	IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen).....	27
2.20.2	AC-Affinitätschromatographie mittels Affigel-Blue.....	27
2.20.3	Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose	28
2.20.4	Proteinanreicherung und Immobilisierung über ProteinA-coated Latex-Beads	28
2.21	Konzentrierung, Entsalzung und Pufferwechsel von Proteinlösungen	29
2.21.1	Ammoniumsulfat Fällung	29
2.21.2	Dialyse	29
2.21.3	Centricon 30, Amicon Ultra 30 und membra spin MINI	29
2.22	Methoden zur Kristallisierung von Proteinen	30
2.22.1	Die Methode des „Sparse-Matrix-Screen“	30
2.22.2	Dampfdiffusionsmethode	32
2.22.3	Färbung und proteinbiochemische Analysen von Kristallen.....	32
2.23	Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP).....	32

2.24	Protein-Crosslinking	34
2.24.1	<i>In vivo</i> -Crosslinking mittels Formaldehyd	34
2.24.2	Crosslinking nach Brown & Kodadek.....	34
2.25	Protease-Schutz-Experiment	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Two-Hybrid-Analyse von lexAGal1 und VP16Gal80 aus <i>K. lactis</i> in der heterologen Hefe <i>S. cerevisiae</i>	36
3.2	Erzeugung neuer gal1-Mutationen durch „Random-PCR-Mutagenese“	37
3.3	Phänotyp-Screen der neuen gal1-Mutanten	39
3.3.1	Charakterisierung der neuen <i>gal1</i> -Interaktionsmutanten im Two-Hybrid-System	39
3.3.2	Komplementation der Induktion einer <i>GAL1</i> -Deletion in <i>K. lactis</i> JA6D1R	40
3.3.3	Wachstum auf Galaktose im <i>GAL1</i> -Deletionsstamm JA6D1R	42
3.3.4	Galaktokinase-Test in <i>S. cerevisiae</i> α MZ4 ($\Delta gal1$) und <i>K. lactis</i> 22A295-1 (<i>gal1-209</i>)	43
3.4	Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen gal1-Mutanten und gal80-Mutanten im Two-Hybrid-System	44
3.4.1	Two-Hybrid-Analyse mit den Gal80-S-Mutanten	44
3.4.2	Two-Hybrid-Analyse mit der Gal80-R10-Mutante	45
3.5	Identifizierung von Interaktionsdomänen durch Protein-Crosslinking und Protease-Verdau	47
3.6.1	Gal1- und Gal80-Crosslinking mit Formaldehyd <i>in vivo</i>	47
3.6.2	Protein-Crosslinking von Gal1 und Gal80 <i>in vitro</i> mit einem 0Å-Crosslinker.....	48
3.6.3	Protease-Schutz-Experiment mit α -Chymotrypsin.....	50
3.7	Kristallisierung der Proteine Gal1-m1, Wildtyp Gal1 und Wildtyp Gal80: einzeln und im Komplex	52
3.7.1	Aufreinigung der Proteine Wildtyp 6xHisGal1 und 6xHisGal1-m1	53
3.7.2	Aufreinigung des Proteins 6xHisGal80	54
3.7.3	Erste Kristalle von Wildtyp Gal1 und Gal1-m1	56
3.7.4	Erneuter Versuch, die Bedingungen der Gal1-Kristallisierung zu optimieren	57
3.7.5	Kristallisierung von Gal1 und Gal80 im Komplex	58
3.8	Strukturmodelle der Galaktokinase und Gal80 durch Homologie-Vergleiche	59
3.8.1	Homologie-Modelling der Galaktokinase Gal1 aus <i>K. lactis</i>	59
3.8.2	Kartierung der <i>gal1</i> - und <i>gal3</i> -Mutanten in das Homologie-Modell von Gal1 aus <i>K. lactis</i>	66
3.8.3	Vorhersage eines Strukturmodells von Gal80	71
3.9	Lokalisierung der Proteine Gal1 und Gal80 in <i>K. lactis</i>	74
3.9.1	Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP) der Proteine Gal1 und Gal80 <i>in vivo</i>	74
3.9.2	Immunfluoreszenz-Analyse der Proteine Gal1 und Gal80 im <i>K. lactis</i> -Stamm JA6.....	77
3.9.3	Lokalisierung von GFPGal1 in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i>	78
4.	DISKUSSION	79
4.1	Die regulatorische Funktion und die Galaktokinase-Aktivität von Gal1 aus <i>K. lactis</i> können durch Aminosäureaustausche inhibiert werden	79
4.2	Charakterisierung der <i>GAL1</i>-Mutationen in der Milchhefe <i>K. lactis</i>	80
4.3	Mutationen von Gal1 geben Hinweise auf Interaktionsdomänen mit Gal80	82
4.4	Protease-Verdau zur Identifizierung der Interaktions-Domänen von Gal1 und Gal80	82
4.5	Kristallisierung von Gal1 und Gal80 aus <i>K. lactis</i>	84

4.6	Homologie-Modelling von Gal1 aus <i>K. lactis</i>	85
4.7	Homologie-Modelling von Gal80 aus <i>K. lactis</i>	86
4.8	Die Lokalisierung von Gal1 und Gal80 in <i>K. lactis</i> versus <i>S. cerevisiae</i>	88
5.	ZUSAMMENFASSUNG	91
6.	LITERATUR	92
7.	ABKÜRZUNGEN	100

1. Einleitung

Die Regulation der Genexpression ist in der Hefe ausführlich untersucht worden (Guarente, 1987, 1988; Struhl, 1989). Signale aus dem Milieu werden über verschiedene Signaltransduktionswege bis auf die DNA-Ebene weitergeleitet und führen zur differentiellen Expression von enzymkodierenden Genen. Eukaryontische Gene enthalten einen RNA-Polymerase II Promotor, an dem die Transkription startet. Im proximalen Promotorbereich (Abbildung 1.1) gibt es generell zwei stark konservierte, essentielle Bereiche, die die Ansatzpunkte für die allgemeine Transkriptionsmaschinerie darstellen. 1.) Die TATA-Box mit der Konsensus-Sequenz TATAAA, die sich bei *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) etwa 40-120 Nukleotide stromaufwärts befindet (Struhl, 1995). In höheren Eukaryonten befindet sich die TATA-Box konstant zwischen Position -25 und -35 des jeweiligen Promotors (Buratowski et al., 1988; Struhl, 1995). 2.) Die Initiationsstelle, an der die Transkription startet. Generell wird sie als Py_2CAPy_2 beschrieben und befindet sich etwa zwischen den Positionen -3 und +5 relativ zum Startpunkt der Transkription (Chen und Struhl, 1985). Im distalen Promotorbereich (Abbildung 1.1) befinden sich Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, sogenannte cis-Elemente, die die Transkription von eukaryontischen Genen positiv oder negativ beeinflussen können (Guarente und McDonogh, 1992). Diese Bereiche werden, wenn sie von Aktivatoren erkannt werden, als UAS-Elemente (Upstream Activating Sequence) bezeichnet. Wird eine Sequenz von einem Repressor gebunden, spricht man von URS-Elementen (Upstream Repressing Sequence). Diese Elemente bestehen aus 10-30 bp langen Promotor-spezifischen Erkennungssequenzen, die sich in der Regel etwa 50-500 bp, manchmal jedoch auch bis zu 1,2 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart befinden (Struhl, 1989).

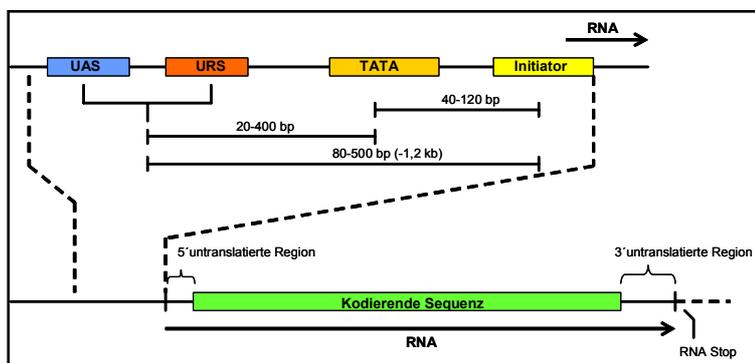


Abbildung 1.1
Typisches Hefe-Gen mit den relativen Positionen der Kontroll-Elemente, schematisch (modifiziert nach Watson *et al.*, 1988).

Transkriptionsfaktoren, die an Promotor-Elemente binden, begünstigen oder verhindern die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes. Die Rekrutierung von an RNA-Polymerase II assoziierten Faktoren (TAF's, TBP, TFII-A,-B,-D,-E,-F und -H, Mediator-, SWI/SNF-Komplex und SAGA; Abbildung 1.2) ist ein essentieller Prozess der Genexpression. Ohne diese Rekrutierung erfolgt lediglich eine basale oder keine Genexpression. Transkriptionsaktivatoren können in zwei verschiedene Kategorien unterteilt werden. Die erste Kategorie beinhaltet DNA-bindende Proteine, die nur dann an ihre spezifische DNA-Erkennungssequenz binden, wenn das Zielgen induziert werden soll. Zu dieser Gruppe gehören Gcn4 (Hinnebusch, 1984) und Hap1 (Pfeiffer *et al.*, 1987). Zur zweiten Kategorie zählen Aktivatorproteine, die konstitutiv an die DNA binden, deren Aktivität jedoch durch weitere Faktoren moduliert werden. Solche Aktivatoren sind Gal4 (Giniger *et al.*, 1985; Selleck und Majors, 1987) und Put3 (Axelrod *et al.*, 1991).

Ptashne (1986 und 1988) konnte zeigen, dass die stromaufwärts bindenden Transkriptionsfaktoren durch Ausbildung einer DNA-Schleife in die räumliche Nähe der Transkriptionsmaschinerie gebracht werden und mit den Untereinheiten dieses multimeren Proteinkomplexes interagieren (Abbildung 1.2). Transkriptionsaktivatoren mit sauren Aktivierungsdomänen, wie z.B. Gal4 und Gcn4, katalysieren den

schrittweisen Zusammenbau des Präinitiationskomplexes, indem sie speziell mit Untereinheiten dieses Komplexes interagieren und sie an den Promotor rekrutieren (Lin und Green, 1991; Roberts und Green, 1994; Wu *et al.*, 1996). Dies hat zur Folge, dass die Untereinheiten gerichtet an den Promotor herangeführt werden und so eine schnelle und effiziente Genaktivierung stattfinden kann. Die Mechanismen der Genregulation sind mittlerweile sehr gut verstanden, jedoch sind viele Fragen der Dynamik und der Protein-Wechselwirkungen dieses multimeren Proteinkomplexes noch nicht ganz aufgeklärt. Vor einigen Jahren ist es gelungen, den RNA-Polymerase II Holoenzymkomplex zu kristallisieren (Kornberg, 1991; Cramer *et al.*, 2001). Mit dieser Struktur ist es nicht nur möglich, sämtliche Protein-Protein-Wechselwirkungen in diesem Komplex vorherzusagen, man ist auch in der Lage die Wechselwirkungen zwischen Domänen einzelner Proteine oder gar Aminosäuren zu identifizieren.

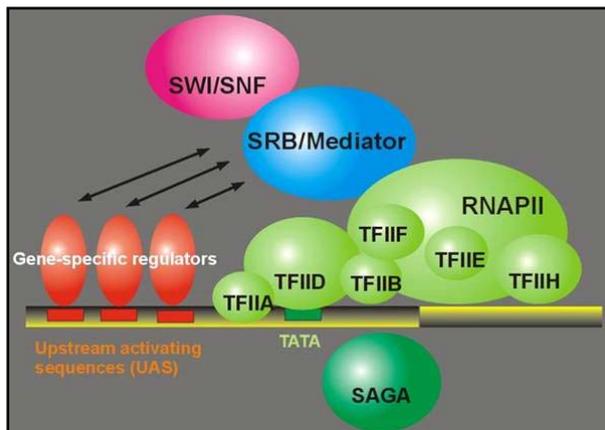


Abbildung 1.2

Generelles Prinzip der Hefe Genexpression (Transkription), (modifiziert nach Holstege *et al.*, 1998).

1.1 Der Galaktose-Metabolismus der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* als Modellsystem für die Genregulation

Neben der Bäckerhefe *S. cerevisiae* als einem der bestcharakterisierten Modellsysteme haben sich andere Hefegattungen wie die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* zur Untersuchung von vielen zellulären Prozessen als hilfreich erwiesen. Im Gegensatz zu den meisten Hefen ist *K. lactis* in der Lage, Laktose als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu verwerten. Die β -Galaktosidase (Genprodukt von *LAC4*), welche Laktose in Glukose und Galaktose hydrolytisch spaltet, wird seit Jahrzehnten im Bereich der Medizin (Milchzucker-Intoleranz) und der Lebensmittelchemie als Nahrungsergänzungsmittel industriell genutzt. Aufgrund der gemeinsamen Regulation sämtlicher Gene, die für den Laktose- und Galaktose-Stoffwechsel notwendig sind, spricht man vom *MEL/GAL*-Regulon in *S. cerevisiae* und vom *LAC/GAL*-Regulon in *K. lactis*. Der Transkriptionsfaktor Gal4 ist essentiell für die Aktivierung der Transkription der Gene des Galaktose-Metabolismus (Leloir-Pathway, Abbildung 1.3). Galaktose wird durch einen Galaktose-Transporter (Gal2 in *S. cerevisiae*, Lac12 in *K. lactis*; Boles und Hollenberg, 1997) in die Zelle eingeschleust. Die intrazelluläre Galaktose wird durch die ATP- α -D-Galaktose-1-Phosphotransferase (Galaktokinase/Gal1) zu Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert. Die aktivierte Galaktose wird auf UDP mittels der Uridin-Diphospho-D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Gal7) übertragen und durch die Uridin-Diphospho-Galaktose-4-Epimerase (Gal10) in UDP-Glukose umgewandelt. Im nächsten Zyklus der Übertragung von Galaktose auf UDP wird Glukose-1-Phosphat freigesetzt (Leloir, 1951). Glukose-1-Phosphat wird durch die Phosphoglukomutase (Gal5) in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und kann in dieser Form in der Glykolyse metabolisiert werden.

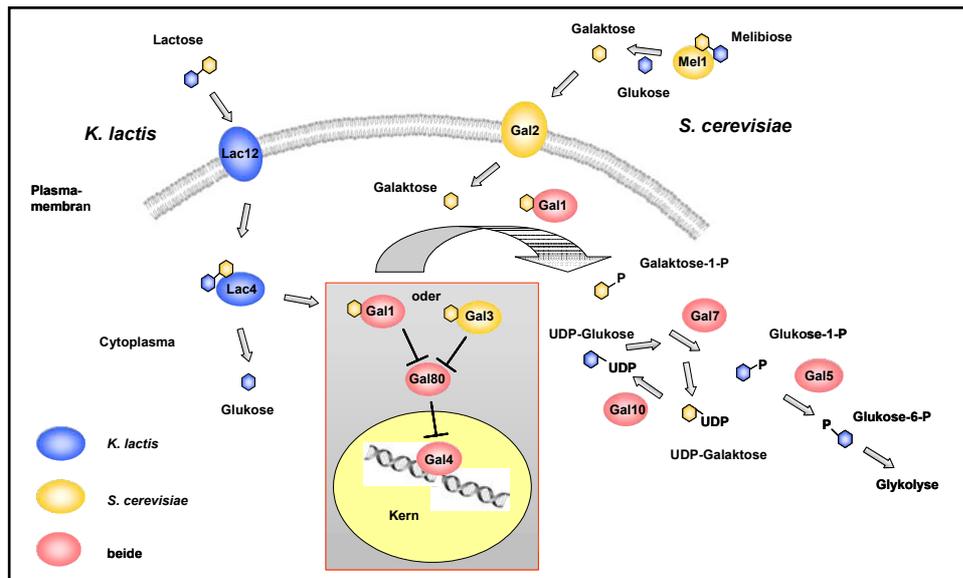


Abbildung 1.3
 Der Leloir-Pathway: Der Laktose- und Galaktose-Stoffwechsel der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und der Milchhefe *K. lactis*

Die Galaktose enthaltenden Disaccharide werden in beiden Hefen unterschiedlich hydrolysiert. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kann Melibiose extrazellulär mit Hilfe der ins Medium sekretierten Melobiase (Mel1) spalten (Lazo *et al.*, 1977; Lazo *et al.*, 1978; Post-Beittenmiller *et al.*, 1984; Liljestrom, 1985). Die Milchhefe *K. lactis* transportiert Laktose und Galaktose über den Laktose/Galaktose Transporter Lac12 in die Zelle. Eine β -Galaktosidase (Lac4) spaltet Laktose intrazellulär (Dickson und Barr, 1983; Sreekrishna und Dickson, 1985; Chang und Dickson, 1988; Shetz und Dickson, 1981).

Die Gene *LAC4* und *LAC12* werden durch einen 2,6 kb großen divergenten Promotor gemeinsam transkribiert (Sreekrishna und Dickson, 1985; Riley *et al.*, 1987; Gödecke *et al.*, 1991). In diesem Promotor befinden sich vier funktionelle Bindungsstellen für den Transkriptionsaktivator Gal4 (Breunig und Kuger, 1987; Ruzzi *et al.*, 1987; Leonardo *et al.*, 1987; Gödecke *et al.*, 1991). Das Prinzip des divergenten Promotors findet man auch bei den Genen *GAL1* und *GAL10*, die für die Proteine Galaktokinase und Epimerase kodieren. Auch in diesem etwa 800 bp grossen Promotor sind vier Bindungsstellen für Gal4 vorhanden, die in einer intergenischen Region zwischen beiden Transkriptionsinitiationsstellen liegen (Gödecke *et al.*, 1991). Das *GAL7*-Gen, welches für die Transferase kodiert, liegt stromabwärts von *GAL10* und besitzt im Promotor zwei Bindungsstellen für Gal4 (Webster und Dickson, 1988). Diese Anordnung in einem Gencluster findet man sowohl bei *S. cerevisiae* als auch bei *K. lactis*. In beiden Hefen ist sie nahezu identisch.

1.2 Die Regulation der *MEL/GAL*-Gene in *S. cerevisiae*

Die *MEL/GAL*-Gene in *S. cerevisiae* werden in Abhängigkeit von der angebotenen Kohlenstoffquelle gemeinsam reguliert (Johnston, 1987; Johnston und Carlson, 1992). Man kann drei verschiedene regulierte Zustände beobachten: A) nicht induziert, B) reprimiert und C) induziert (Abbildung 1.4). In Anwesenheit einer neutralen Kohlenstoffquelle wie Glycerin liegen die *MEL/GAL*-Gene in einem nicht induzierten Zustand vor. Dabei bindet Gal4 an die UAS_{GAL} -Elemente, wobei dessen Aktivität durch den Inhibitor Gal80 reguliert wird. Eine *gal80*-Deletion resultiert in extrem hohen Transkriptspiegeln aller Gal4-abhängigen Gene, die höher liegen als in induzierten Wildtyp-Zellen (Torchia *et al.*, 1984). Die *MEL/GAL*-Gene sind beim Wechsel von Glycerin nach Galaktose innerhalb weniger Minuten aktiviert, während die Induktion nach Wachstum in Glukose mehrere Stunden dauert (Johnston, 1987). In Anwesenheit von Glukose im Medium unterliegen die *MEL/GAL*-Gene wie andere nicht benötigte Stoffwechselwege der Glukose-Repression. Diese Expressionskontrolle ist daher nicht

nur auf die *MEL/GAL*-Gene beschränkt und kann als übergeordnetes Regulationssystem für den Metabolismus vieler Mono- und Disaccharide angesehen werden. Die Repression wird durch den Transkriptionsfaktor Mig1 vermittelt, der an die URS-Elemente der *MEL/GAL*-Gene bindet und im Komplex zusammen mit den beiden Corepressoren Cyc8-Tup1 (früher Ssn6-Tup1) die Interaktion von Gal4 mit dem Transkriptionsinitiationskomplex verhindert (Nehlin et al., 1991; Keleher et al., 1992). Mig1 tritt dabei in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle in verschiedenen stark phosphorylierten Formen auf, welche als Antwort auf Glukose als Kohlenstoffquelle im Medium die Kernlokalisierung beeinflussen (Treitel und Carlson, 1995, 1998; De-Vit et al., 1997). In Abwesenheit von Glukose inaktiviert die Snf1-Proteinkinase (Cat1) u.a. Mig1 und führt im Komplex mit Snf4 (Trumbly, 1992; Treitel et al., 1998) zur Derepression vieler Glukose-reprimierter Gene (Celenza und Carlson, 1986; Woods et al., 1994; Jiang und Carlson, 1996; Wilson et al., 1996). In einem Two-Hybrid-System konnte die direkte Interaktion zwischen Mig1 und Snf1 nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Snf1 Kinase die Mig1 Phosphorylierung Kohlenstoffquellen-abhängig reguliert (Treitel et al., 1998). Die Repression durch Glukose betrifft alle *MEL/GAL*-Gene. Jedoch führt diese Form der Glukose-vermittelten Repression nicht zur vollständigen Reprimierung der *MEL/GAL*-Gene. Die Expression der Gal4-abhängigen *MEL/GAL*-Gene wird durch einen weiteren Mechanismus kontrolliert. In Abwesenheit von Galaktose verhindert Gal80 die Transkriptionsaktivierung der *MEL/GAL*-Gene durch Bindung der Gal4-Aktivierungsdomäne am C-Terminus (Brent und Ptashne, 1985; Johnston et al., 1986; Ma und Ptashne, 1987; Johnston, 1987; Leuther und Johnston, 1992). Dadurch wird die Bindung an die allgemeine Transkriptionsmaschinerie unterbunden, und der Transkriptionsinitiationskomplex kann nicht effizient gebildet werden. Nur beide Regulationsmechanismen führen zur vollständigen Repression der *MEL/GAL*-Gene.

Unter induzierenden Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Galaktose im Medium, wird die Transkription der durch Gal4 aktivierbaren Gene in *K. lactis* in Anwesenheit einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Laktat (nicht induzierend) um den Faktor 10-100 und in *S. cerevisiae* um den Faktor 1000 induziert. Mutationen oder Deletionen des *GAL4*-Gens führen zum Verlust der Induzierbarkeit. Man beobachtet lediglich eine basale Expression der von Gal4 kontrollierten Gene (Douglas und Hawthorne, 1966; Kew und Douglas, 1976; Wray et al., 1987). Durch die Anwesenheit von Galaktose wird die Aktivierungsdomäne von Gal4, die durch Gal80 maskiert wurde, freigegeben und kann so mit der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung treten und die Transkription der *MEL/GAL*-Gene aktivieren. Nach dem Modell von Leuther und Johnston (1992) sind Gal4 und Gal80 auch unter induzierenden Bedingungen miteinander assoziiert und können nach Anzucht im Galaktose-haltigen Medium in einem Gal4/Gal80-Komplex isoliert werden (Chasman and Kornberg, 1990). Im Fall der Induktion scheint es zu einer Konformationsänderung des Gal4/Gal80-Komplexes zu kommen (Leuther und Johnston, 1992), in deren Folge die Aktivierungsdomäne von Gal4 freigegeben wird. Neuere Studien zeigen, dass Gal80 bei Galaktose-Induktion im Cytoplasma einen Gal80/Gal3-Komplex bildet. So wird Gal80 aus dem Zellkern weg titriert mit der Folge, dass es zu einer Derepression kommt. In *S. cerevisiae* ist das *GAL3*-Genprodukt für die Induktion der *MEL/GAL*-Gene notwendig. *GAL3*-Deletionsmutanten zeigen einen „Long Term Adaption“-Phänotyp, d.h. eine um 48-120 Stunden verzögerte Induktion der *MEL/GAL*-Gene (Winge und Roberts, 1948; Mundkur, 1952; Adams et al., 1977; Torchia und Hopper, 1986; Bajwa et al., 1988). Gal3 weist eine starke Homologie zum *S. cerevisiae* Gal1 und zum *K. lactis* Gal1 auf, besitzt aber keine Kinaseaktivität (Bajwa et al., 1988). Wie *GAL80*, so unterliegt auch *GAL3* einer Koregulation mit den *MEL/GAL*-Genen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Gal3/Gal80/Gal4-Komplex *in vitro* gebildet werden kann (Platt et al., 1998). Allerdings ist bisher unklar, ob dieser

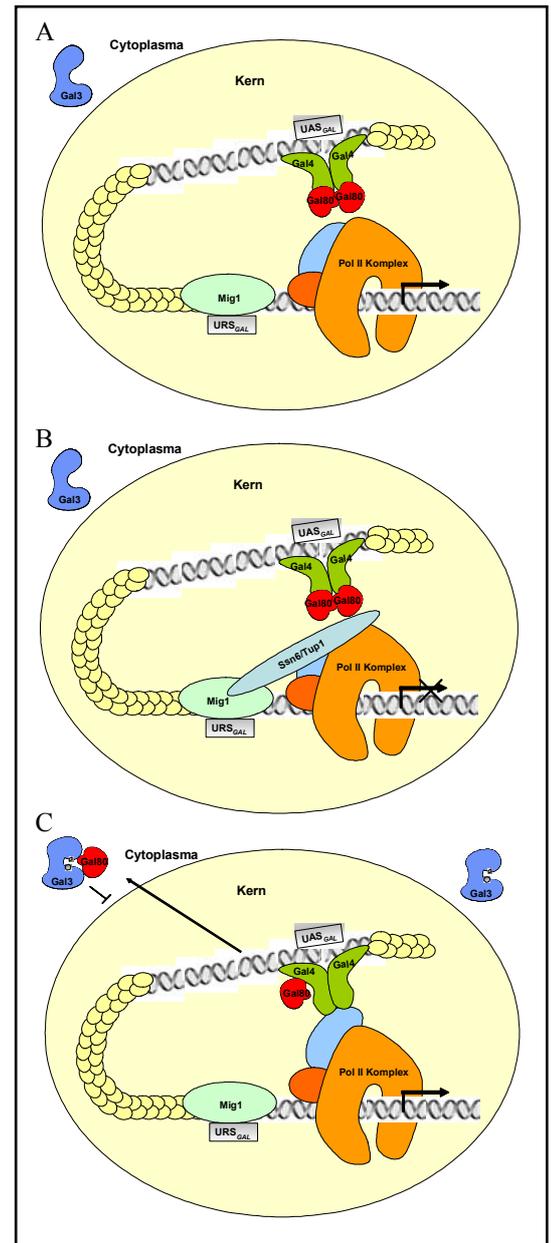


Abbildung 1.4
Die Regulation der *MEL/GAL*-Gene in *S. cerevisiae*.
A: nicht induzierter Zustand auf Glycerin.
B: reprimierter Zustand auf Glukose.
C: induzierter Zustand auf Galaktose.

Komplex auch *in vivo* gebildet wird. Hopper zeigte im letzten Jahr (Peng und Hopper, 2002), dass im Cytoplasma immobilisiertes Gal3 ausreichend ist, um ein Signal zu vermitteln, das eine Translokation von Gal80 aus dem Zellkern ins Cytoplasma zur Folge hat. Im Cytoplasma wird dann Gal80 von Gal3 gebunden und eine Rückkehr in den Zellkern verhindert („Trapping“). Bisher ging man davon aus, dass Gal3 in den Zellkern wandert und dort mit Gal80 interagiert, um eine Transkriptionsaktivierung zu bewirken.

1.3 Die Regulation der *LAC/GAL*-Gene in *K. lactis*

Die Regulation der *LAC/GAL*-Gene in *K. lactis* ist vergleichbar mit dem Modell aus *S. cerevisiae*. Es besteht allerdings ein grosser Unterschied in der Repression. In *S. cerevisiae* wird die Repression durch zwei Mechanismen erreicht: 1.) durch die Rekrutierung des Co-Repressor-Komplexes Cyc8/Tup1 durch Mig1 und 2.) durch die Maskierung der Aktivierungsdomäne von Gal4 durch Gal80. In *K. lactis* gibt es keine durch Mig1-vermittelte Glukoserepression. Es konnte zwar Mig1 in *K. lactis* identifiziert werden, aber es gibt keine DNA-Bindestellen für Mig1 auf den *GAL*-Promotoren (Georis *et al.*, 1999). Dennoch sind bei *K. lactis* Stämme mit einer starken oder schwachen bis keiner Glukoserepression bekannt. Wie stark bei einem *K. lactis*-Stamm die Induktion der *LAC/GAL*-Gene durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert wird, ist von dem *GAL4*-Allel dieses Stammes abhängig (Breunig, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung zweier Basenpaare in der Promotorregion des *GAL4* (Position -178 und -192 vom ATG aus) ausreicht, um aus einem nicht reprimierbaren Stamm einen durch Glukose reprimierbaren zu machen. Durch die Änderung im Promotorbereich kommt es zu einer verringerten Expression des *GAL4*-Gens und damit zu einer Abnahme der Gal4-Konzentration in der Zelle, so dass die Glukoserepression einsetzt (Zachariae *et al.*, 1993). Die Konzentration des *GAL4*-Genprodukts ist ein entscheidendes Kriterium für die Glukoserepression in *K. lactis*. Eine erhöhte Expression dieses Transkriptionsaktivators führt in der Zelle zum Verlust der Glukose-Repression. In *K. lactis* wird also das Ausmaß der Glukose-vermittelten Repression viel stärker durch den Aktivator bestimmt als in *S. cerevisiae*. Die für *S. cerevisiae* beschriebenen Gal4-unabhängigen Mechanismen scheinen in *K. lactis* nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Transkription der *LAC/GAL*-Gene wird daher durch die Menge der Regulatorproteine Gal4 und Gal80 vermittelt. Die Funktion des Co-Regulators, die in *S. cerevisiae* durch Gal3 repräsentiert wird, wird in *K. lactis* durch die Galaktokinase Gal1 übernommen. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Proteine Gal3 und Gal1 lediglich durch den Besitz einer Kinase-Funktion. Das *K. lactis* Gal1 vermittelt das Galaktose-Signal. Auch Gal1 aus *S. cerevisiae* kann als Co-Regulator fungieren. Allerdings ist die Affinität von Gal1 in *S. cerevisiae* deutlich geringer als die von Gal3. Northern-Analysen ergaben, dass *GAL3* und *MEL1* im Gegensatz zu *GAL1*, *GAL7* und *GAL10* bereits in Abwesenheit von Galaktose, also unter dereprimierenden Bedingungen, in größerer Menge transkribiert werden. In Anwesenheit von Galaktose wird jedoch *MEL1* um den Faktor 100, das *GAL1*-Gen um den Faktor 1000, *GAL3* jedoch nur um den Faktor 5 weiter induziert (Bajwa *et al.*, 1988). Daher wird die Funktion des Co-Regulators für die schnelle Induktion der *GAL*-Gene in *S. cerevisiae* hauptsächlich durch Gal3 vermittelt, welches zusätzlich als intrazellulärer Sensor dient.

1.4 Gal4, der Transkriptionsaktivator der *GAL*-Gene

Das *GAL4*-Gen kodiert für ein Protein, bestehend aus 881 Aminosäuren (Laughon und Gesteland, 1984). Homodimere von Gal4 binden an die palindromische Konsensussequenz CGGN₁₁CCG, welche sich in allen Promotoren der von ihnen kontrollierten Gene in unterschiedlicher Anzahl wiederfindet. Gal4 aktiviert die Transkription durch Erhöhung der Komplexbildungsrate des Präinitiationskomplexes. Gal4 besitzt zwei funktionelle Domänen, die eine solche Aktivität ermöglichen. Am N-

Terminus innerhalb der ersten 74 Aminosäuren befindet sich eine DNA-Bindedomäne (Keegan *et al.*, 1986), die durch Komplexbildung von zwei Zink-Ionen eine für viele DNA-Bindeproteine typische Zinkfinger-Struktur bildet (Pan und Coleman, 1989; Pan und Coleman, 1990). Die Zn^{2+} -enthaltende Domäne kontaktiert die konservierten CCG-Triplets in der grossen Furche der DNA, wie durch Kristallisierung des Gal4/DNA-Komplexes gezeigt werden konnte (Baleja *et al.*, 1992; Kraulis *et al.*, 1992; Marmorstein *et al.*, 1992; Abbildung 1.5). Im Bereich der Aminosäuren 74-147 befindet sich eine Leucin-Zipper-ähnliche Struktur, die für die Dimerisierung essentiell ist (Carey *et al.*, 1989; Marmorstein *et al.*, 1992).

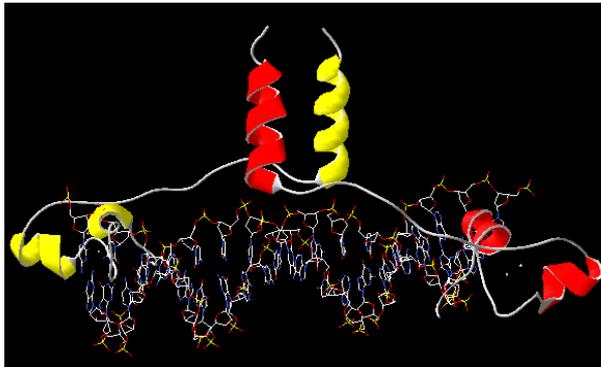


Abbildung 1.5
Kristallstruktur der Gal4
DNA-Bindedomäne und
Dimerisierungsdomäne
(Marmorstein *et al.*, 1992).

Für die Aktivierung der Transkription ist im wesentlichen ein C-terminaler Bereich des Transkriptionsfaktors verantwortlich. Gal4 besitzt zwei verschiedene Aktivierungsdomänen (Aktivierungsdomäne II: AS768-881 und Aktivierungsdomäne I: AS 148-196). Die Bedeutung der ersten Aktivierungsdomäne ist fraglich und nur erkennbar, wenn der grösste Teil des C-Terminus entfernt wird. Die Aktivierungsdomäne II, insbesondere die Aminosäuren 854-874, sind ausreichend für die Transkriptionsaktivierung und notwendig für die Interaktion mit dem Inhibitor Gal80 (Johnston, 1987). Diese C-terminale Domäne zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren aus (Ma und Ptashne, 1987), wie sie beispielsweise auch für den Hefe-Transkriptionsfaktor Gcn4 (Hope *et al.*, 1988) und den viralen Transkriptionsfaktor VP16 (Sadowski *et al.*, 1988; Triezenberg *et al.*, 1988; Cress und Triezenberg, 1991) charakteristisch sind. Dieser saure Bereich neigt zur Ausbildung einer amphipatischen α -Helix oder eines unstrukturierten „acid blobs“. Für Gal4 konnte gezeigt werden, dass die negativen Ladungen nicht essentiell für die Transkriptionsaktivierung sind. Zudem konnte in spektroskopischen Analysen gezeigt werden, dass sich in Lösung ein β -Faltblatt bildet (Leuther *et al.*, 1993; van Hoy *et al.*, 1993).

Der Transkriptionsaktivator Gal4 wird in *S. cerevisiae* durch Phosphorylierung modifiziert (Mylin *et al.*, 1989; Mylin *et al.*, 1990; Parthun und Jaehning, 1992). In Abwesenheit von Galaktose im Medium bildet sich eine Form I mit einem apparenten Molekulargewicht von 99 kD. In Anwesenheit von Galaktose erscheinen dann jedoch zwei verschieden stark phosphorylierte Formen, Form II (105 kD) und Form III (108 kD). Diese beiden Protein-Formen korrelieren mit der um den Faktor 1000 höheren Genexpression aller Gal4-abhängigen Gene. Die Phosphorylierungsstellen konnten an den Serin-Resten Ser₈₃₇, Ser₆₉₁, Ser₆₉₆ und Ser₆₉₉ kartiert werden. Die Gal4-Phosphorylierung an Ser₆₉₉ ist essentiell für die Galaktose-vermittelte Induktion der Transkription. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierungsstelle ein Substrat für die RNA-Polymerase-II-assoziierte und Cyclin-abhängige Proteinkinase Srb10/CDK8 ist (Rhode *et al.*, 2000) und vermutlich die Interaktion zwischen dem Aktivator Gal4 und dem Repressor Gal80 verändert (Sadowski *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1999).

Der Gal4-Transkriptionsaktivator aus *K. lactis* ist ein Protein mit 865 Aminosäuren (Salmeron und Johnston, 1986). Die DNA-Bindung erfolgt wie in *S. cerevisiae* nach Dimerisierung an die Erkennungssequenz CCGN₃/TN₃CCG (Pan *et al.*, 1990; Halvorsen *et al.*, 1990). Gal4 aus *K. lactis* kann Gal4 aus *S. cerevisiae* ersetzen und umgekehrt (Salmeron und Johnson, 1986; Riley *et al.*, 1987). Beide Proteine besitzen eine Identität

von etwa 30%. Diese Übereinstimmung ist aber auf drei distinkte Bereiche der Proteine beschränkt. Die höchste Homologie findet man dabei in der C-terminalen Region im Bereich der Aktivierungsdomäne II, so dass man annehmen kann, dass hier die Interaktion zwischen dem Aktivator Gal4 und dem Repressor Gal80 stattfindet. Diese direkte Wechselwirkung konnte durch Zenke *et al.* (1999) in *in vitro*-Bindungsstudien gezeigt werden. Trotz dieser gleichartigen regulatorischen Wechselwirkungen in *S. cerevisiae* und *K. lactis* konnte jedoch bislang keine Phosphorylierung von Gal4 aus *K. lactis* gezeigt werden (Zenke *et al.*, 1999).

1.5 Gal80, der Transkriptionsrepressor der GAL-Gene

Der Transkriptionsrepressor Gal80 inhibiert die Aktivität des Transkriptionsaktivators Gal4 durch direkte Interaktion mit den letzten 28 C-terminalen Aminosäuren von Gal4. Gal80 maskiert dadurch die Aktivierungsdomäne von Gal4 und verhindert so die Transkriptionsaktivierung der *GAL*-Gene (Lue *et al.*, 1987; Johnston *et al.*, 1987; Leuther und Johnston, 1992; Zenke *et al.*, 1999). Gal80 dimerisiert mit hoher Affinität und stabilisiert so die Gal80/Gal4-Interaktion in einem (Gal4)₂(Gal80)₂-Komplex. Nur in dieser Form kommt es dann auch zu einer kompletten Reprimierung der *GAL*-Gene (Melcher und Xu, 2001). Durch die Bindung von Gal80 an Gal4 wird eine Interaktion zwischen dem SAGA-/NuA4-HAT-Komplex mit Gal4 blockiert. Dies hat zur Folge, dass eine Acetylierung der Nukleosomen ausbleibt und das TATA-Binde-Protein (TBP) nicht an den Promotor rekrutiert werden kann (Carrozza *et al.*, 2002). Ein Transkriptionspräinitiationskomplex kann dadurch nicht ausgebildet werden.

Das *GAL80*-Gen aus *K. lactis* konnte durch Komplementation einer Mutante mit konstitutiver *LAC/GAL*-Genexpression isoliert werden (Dickson *et al.*, 1981; Zenke *et al.*, 1993). Ein Sequenzvergleich mit dem Inhibitor Gal80 aus *S. cerevisiae* ergab 60% Identität, wobei der Anteil der konservierten Aminosäure-Reste über das ganze Protein verteilt ist. Innerhalb der Gal80-Aminosäuresequenz aus *K. lactis* wurden zwei zentrale Bereiche mit 80% identischen Aminosäuren identifiziert. Diese Regionen erstrecken sich zum einen über die Aminosäuren 324-365 und zum anderen über die Positionen 369-413. Mutationsanalysen, insbesondere in der zweiten Region, haben gezeigt, dass dieser Bereich essentiell für die Interaktion zu Gal4, aber auch Gal3 bzw. Gal1 ist (Douglas und Hawthorne, 1972; Nogi *et al.*, 1977; Nogi und Fukasawa, 1989; Yano und Fukasawa, 1997; Platt und Reece, 1997; Timson *et al.*, 2002).

Im Promotor von *GAL80* befinden sich zwei UAS_{GAL}-Elemente. Somit ist die *GAL80*-Expression wie alle anderen *GAL*-Gene von der Gal4-Aktivierung abhängig. Unter induzierenden Bedingungen wird die Transkription von *GAL80* um den Faktor 3-5 induziert (Nogi *et al.*, 1984; Shimada und Fukasawa, 1985; Igarashi *et al.*, 1987; Zenke *et al.*, 1993). Der Inhibitor Gal80 kontrolliert über die Modulation der Gal4-Aktivität seine eigene Expression und unterliegt damit einer negativen Autoregulation. Die Inhibitor-Konzentration steigt solange an, bis die Inhibitor-Aktivität die transkriptionsaktivierende Wirkung von Gal4 am *GAL80*-Promotor limitiert. Die Induktion der *GAL80*-Expression erlaubt eine der Galaktose-Konzentration entsprechende *LAC4/LAC12*-Genexpression.

Gal80 wird in *K. lactis* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle im Medium durch Phosphorylierung modifiziert. Diese Modifikation konnte bislang in *S. cerevisiae* nicht gezeigt werden. Die Gal80-Phosphorylierung ist aber nur in Abwesenheit von Galaktose zu beobachten. Dabei scheint die Anwesenheit von Gal1 für die nicht-phosphorylierte Form essentiell zu sein, da in einem *GAL1*-Deletionsstamm konstitutiv die phosphorylierte Form von Gal80 nachweisbar ist (Zenke *et al.*, 1999). Inwieweit die Phosphorylierung von Gal80 die Induktion der *LAC/GAL*-Gene beeinflusst, ist bisher unklar.

1.6 Gall, ein bifunktionelles Protein des LAC/GAL-Regulons

GAL1 kodiert in *K. lactis* für ein Protein mit 503 Aminosäuren, das zum einen als erstes Enzym des Leloir-Stoffwechselweges Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat umsetzt und zum anderen als Co-Regulator essentiell für die Induktion der *LAC/GAL*-Gene ist (Abbildung 1.3). Eine *GAL1*-Deletion in *K. lactis* verhindert im Gegensatz zu *S. cerevisiae* eine Induktion des Regulons (Meyer *et al.*, 1991). Meyer konnte zeigen, dass Gall neben der katalytischen Funktion eine zweite regulatorische Funktion besitzt, die in der Lage ist, eine Gal3-ähnliche Funktion in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Beide Funktionen sind durch Mutationen voneinander trennbar (Meyer *et al.*, 1991; Vollenbroich *et al.*, 1999). Ein Sequenzvergleich von eukaryotischen Galaktokinasen, einer prokaryotischen Galaktokinase und Gal3 aus *S. cerevisiae* zeigt einen hohen Grad an Homologie über das gesamte Protein. Fünf wichtige konservierte Blöcke können anhand dieses Sequenzvergleichs hervorgehoben werden (Abbildung 1.6).

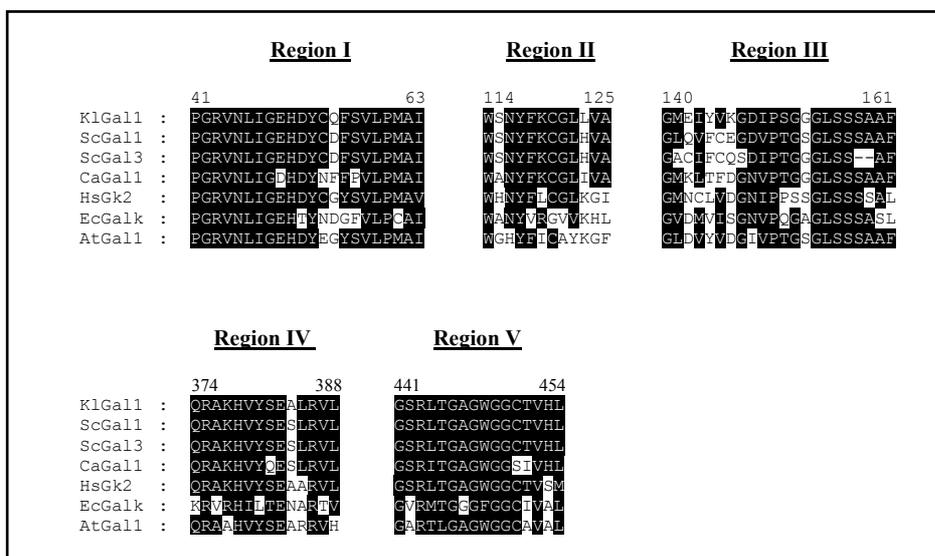


Abbildung 1.6 Sequenzvergleich zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Galaktokinasen und Gal3 aus *S. cerevisiae*. Es wurden die Aminosäuresequenzen der Galaktokinase aus *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* von einer humanen Galaktokinase, Gk2 (Lee *et al.*, 1992), der Galaktokinase aus *Arabidopsis thaliana* (*ARA1*, Sherson *et al.*, 1999), der Galaktokinase GalK aus *E. coli* und des Gal3 aus *S. cerevisiae* miteinander verglichen. Die Analyse wurde mit dem Alignment-Programm ClustalW durchgeführt.

Die Funktion der üblichen Galaktokinasen ist auf die Bindung des Zuckers, des Co-Substrates ATP und die Bildung von Galaktose-1-Phosphat beschränkt. Diesen Funktionen können zwei der fünf konservierten Bereiche der Galaktokinasen zugeordnet werden. Der erste Bereich ist bei allen Galaktokinasen und Gal3 stark konserviert und gilt als Zuckerbindungsstelle. Sie befindet sich am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 41-63 und wird auch als Region I bezeichnet. Der zweite Bereich liegt zwischen den Aminosäuren 140-161 (Region III) und ist eine typische Protein-Domäne, die in vielen Kinasen konserviert ist. Durch einen Vergleich mit anderen Kinasen einigte man sich auf die Konsensus-Sequenz PXaa₃GLXSSAA. Diese Sequenz formt einen "phosphate binding loop" (P-loop) und interagiert mit dem α- und β-Phosphat des ATP. Der klassische P-loop ist eine unstrukturierte Verbindung zwischen einem β-Faltblatt und einer α-Helix in der Nähe des aktiven Zentrums (Saraste *et al.*, 1990; Tsai und Robinson, 1991; Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001; Bonanno *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Romanowski *et al.*, 2002). Homologie-Vergleiche anhand dieser Motive ergaben, dass die Galaktokinasen in die Familie der GHMP-Kinasen (Galaktokinase, Homoserinkinasen, Mevanolatkinasen und Phosphomevalonatkinasen) und nicht in die der Hexokinasen einzuordnen sind (Bork *et al.*, 1993). Für diese Familie konnten kürzlich verschiedene dreidimensionale Strukturen bestimmt werden (Zhou *et al.*, 2000; Bonanno *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Romanowski *et al.*, 2002). Diese Strukturen verdeutlichten, dass die Familie der GHMP's nicht nur einen hohen Grad an Sequenz-Homologien aufzuweisen haben, sondern auch in ihrer dreidimensionalen Struktur eine gleichartige Faltung zeigen. Es kann daraus geschlossen werden, dass die meisten Mitglieder dieser Protein-Familie einen vergleichbaren strukturellen Aufbau haben (Bonanno *et al.*, 2001). Die Dynamik der katalytischen Funktion ist in diesen Molekülen vergleichbar mit vielen anderen

Kinasen, auch denen, die nicht dieser Familie zugehörig sind (Anderson *et al.*, 1979). Durch die Bindung des Substrates und des Co-Substrates kommt es zu einer Konformationsänderung sowohl beim Co-Substrat als auch beim Enzym in der Nähe des aktiven Zentrums. Das aktive Zentrum wird aus zwei Lippen geformt, die eine Art Spalt bilden. Nach Bindung der Substrate werden diese durch die flexible obere Lippe und die Ausbildung einer Salz-Brücke umschlossen und so dem äusseren Milieu entzogen. Die Konformationsänderung bewirkt, dass die Substrate in räumliche Nähe gelangen, wodurch ein nucleophiler Angriff möglich wird, bei dem ein Phosphat übertragen wird. Ein solcher Mechanismus, die Schließung eines Spaltes, wird auch als "induced fit", als eine induzierte Anpassung bei der Enzym-Substrat-Wechselwirkung bezeichnet.

Die Dereprimierung der *GAL*-Gene wird durch eine direkte Bindung von Galaktose und ATP mit Gal1 in *K. lactis* und Gal3 in *S. cerevisiae* vermittelt. Die dadurch bewirkte Konformationsänderung scheint eine Bindung von Gal1 bzw. Gal3 mit dem transkriptionellen Repressor Gal80 zu ermöglichen. Durch *in vitro* Bindungsstudien konnte eine Interaktion dieser Proteine nachgewiesen werden (Zenke *et al.*, 1996). Diese Komplexbildung wurde nur detektiert, wenn dem Enzym beide Substrate, Galaktose und ATP mit $MgCl_2$ als Co-Faktor, angeboten wurden. Die Zugabe anderer Zucker, wie z.B. Glukose, Fruktose, Maltose, Mannose oder Sukrose, führte nicht zu einer Interaktion der jeweiligen Proteine (Zenke *et al.*, 1996; Reece und Platt, 1997). Somit kann die Galaktokinase als erstes Galaktose-verstoffwechselndes Enzym selbst das Signal der Galaktose bis zur Regulation der Gal4-aktivierbaren Gene weiterleiten. Zur Zeit wird diskutiert, ob Gal1 bzw. Gal3 mit Galaktose und ATP gebunden in den Zellkern gelangen muss, um dort mit Gal80 zu interagieren. Es gibt Hinweise in *S. cerevisiae*, dass eine Translokation in den Kern nicht nötig ist, um ein Galaktose-Signal zu vermitteln (Peng und Hopper, 2002). Andererseits konnten Platt und Reece (1998) *in vitro* einen trimeren Komplex (Gal3/Gal80/Gal4) nachweisen. Dies bedeutet, dass ein möglicher Dreierkomplex auch im Kern gebildet werden könnte. Aus beiden Arbeiten kann geschlossen werden, dass schon geringe Mengen von Gal3 im Zellkern ausreichend sind, um dort den Komplex von Gal80 und Gal4 zu destabilisieren. So könnte ein trimerer Komplex im Kern, aber auch ein cytoplasmatischer Gal3/Gal80-Komplex begründet werden. Ob dies auch für *K. lactis* gilt, muss noch gezeigt werden. Interessanterweise ist die Galaktokinase-Aktivität für die Übertragung des Galaktose-Signales auf die *GAL*-Gene nicht essentiell. Gal3 kann beide Substrate binden, aber nicht umsetzen. Dennoch ist Gal3 das wichtigste Protein zur Übermittlung des Galaktose-Signales in *S. cerevisiae*. In Zellen mit intaktem *GAL3* ist eine Induktion der *GAL*-Gene schon innerhalb weniger Minuten nach Galaktosezugabe ins Medium nachweisbar (Torchia und Hopper, 1986; St.John und Davis, 1981). *gal3*-Mutanten zeigen eine um 2-5 Tage verzögerte Induktion, was als „long term adaption“-Phänotyp bezeichnet wird (Winge und Roberts, 1948; Mundkur, 1952; Adams *et al.*, 1977; Torchia und Hopper, 1986; Bajwa *et al.*, 1988). Platt *et al.* (2000) konnten zudem zeigen, dass Gal3 durch Insertion eines Alanins oder eines Serins an Position 164 (Region III; P-loop) zu einer schwachen Galaktokinase konvertiert werden kann und eine *GAL1*-Deletion in *S. cerevisiae* komplementiert. Durch Mutagenese von *GAL3* in *S. cerevisiae* und *GAL1* in *K. lactis* konnten zudem auch verschiedene konstitutive und regulatorisch defekte Mutanten (mit und ohne Kinase-Aktivität) isoliert werden. Diese Mutanten zeigen Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Galaktose- und ATP-Bindung sowie in ihrer Interaktion mit Gal80 (Blank *et al.* 1997; Vollenbroich *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wird diese Funktion anhand einer möglichen dreidimensionalen Struktur von Gal1 aus *K. lactis* erläutert.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkung der Proteine Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* *in vivo* und *in vitro* genauer zu charakterisieren und die Interaktionsdomänen zwischen den Proteinen Gal1 und Gal80 zu identifizieren. Mit Hilfe einer Mutagenese von Gal1 und verschiedenen Deletionen von Gal80 sollte zunächst in einem Two-Hybrid-System die Interaktion der Fusionsproteine lexAGal1 und VP16Gal80 näher charakterisiert werden. Komplementationstests in *K. lactis* sollten die erhaltenen Daten überprüfen. In einem zweiten Ansatz sollten durch Crosslinking-Experimente die Interaktionsdomänen der Proteine Gal1 und Gal80 untersucht werden. Im weiteren werden diese Ergebnisse in einem Gal1 und Gal80 Strukturmodell, basierend auf einem Homologie-Modelling, zusammengebracht. Im letzten Teil dieser Arbeit wird die Lokalisierung der Proteine Gal1 und Gal80 durch CHIP-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht und anhand dessen das Regulationsmodell der *GAL*-Gene in *K. lactis* vervollständigt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme und Antikörper

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den folgenden Herstellern bezogen:

Acros Organics (New Jersey); Amersham International plc. (Buckinghamshire, England); Amersham Biosciences AB (Schweden); Amicon (Beverly); Baker (Deventer, Niederlande); BioRad (Richmond, USA); Biozym (Hess., Oldenburg); Braun (Melsungen); Caesar & Loretz GmbH (Hilden); CloneTech, Dianova (Hamburg), Difco-Laboratories (Detroit, USA); Fluka AG (Basel, Schweiz); Gibco (Paisley, Schottland); Janssen Chimica; Macherey-Nagel; Merck; Millipore; Oxoid; Pharmacia (Freiburg); Pierce; Qiagen (Hilden); Riedel de Haën (Seelze); Roche (Mannheim); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg); Sigma (St. Louis, USA); Sigma ARK; Whatman (Maidstone).

2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme, die Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40), die L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27), T4-Ligase, Phosphatase, Klenow-Fragment der T4-DNA-Polymerase, das "Expand-High-Fidelity"-PCR System und die Taq-DNA-Polymerase, wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL, New England Biolabs, MIB Fermantas und Biomaster (Windeck-Herchen) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

polyklonaler Gal1-Antikörper aus Kaninchen (Meyer, 1991), polyklonaler Gal80-Antikörper aus Kaninchen (Zenke, 1995), polyklonaler VP16-Antikörper aus Kaninchen (CloneTech), monoklonaler TetraHis-Antikörper aus der Maus (Qiagen, Hilden), monoklonaler LexA-Antikörper aus der Maus (CloneTech), monoklonaler ProteinA-Antikörper aus der Maus (Sigma) dienten als Erst-Antikörper.

Als Zweit-Antikörper wurden verwendet: monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (BioRad, München), monoklonaler Anti-Maus-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Dianova, Hamburg), monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Horseradish Peroxidase (Dianova, Hamburg), monoklonaler Anti-Maus-IgG konjugiert mit Horseradish Peroxidase (Dianova, Hamburg), monoklonaler Anti-Maus-IgG gekoppelt mit FITC (Sigma), monoklonaler Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Cy3 (Sigma).

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

DH5 α F['] F['] endA *1hsdR17* r_k⁻ m_k⁺ *supE44 thi-1 gyrA relA* Δ (*lacZYA-argF*) U 169 (ϕ 80 Δ (*lacZ*) M15) (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA)

2.2.2 Medien, Anzucht und Lagerung von Bakterienstämmen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C in Vollmedium (Luria-Broth), bestehend aus 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl. Das Antibiotikum Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 500 μ g/ml nach dem Autoklavieren des Mediums zugesetzt. Festes Medium enthielt zusätzlich 2 % Agar. Nach Anzucht der Bakterienstämme wurden diese bei 4°C gelagert und nach drei Monaten auf frisches Medium überimpft. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden sie als Stockkulturen in 50% Glyzerin bei -70°C gelagert.

2.2.3 *Kluyveromyces lactis*

JA6 *MAT α ade A-600 ade B-600 RAG1-6 HXTb ura3-12 trp1-11 LAC9-2* (Breunig and Kuger, 1987)
JA6D1R *MAT α ade A-600 ade B-600 RAG1-6 HXTb ura3-12 trp1-11 LAC9-2 gal1::Scura3* (Zenke *et al.*, 1996)
JA6D802R *MAT α adeA-600 adeB-600 RAG1-6 HXTb ura3-12 trp1-11 LAC9-2 gal80^Δ2::Scura3* (Zenke, 1993)
KB6-2C *ade1-1 ura3-12 his* (Breunig, pers. Mitteilung)
 22A295-1 *ade1-1 ura3-12 gal1-209* (Meyer, 1991)
MS7-62 *MAT α uraA lys2 arg rag2 Kladh1::ScURA3 Kladh2::ScURA3 Kladh3::ScURA3 Kladh4::ScURA3* (Falcone, pers. Mitteilung)
22A295-1 *ade1-1 ura3 gal1-209* (Vollenbroich *et al.*, 1999)

2.2.4 *Sacharomyces cerevisiae*

CTY10-5d *ade2 trp1 leu2 his3 gal4 gal80 URA3::lexA op-lacZ* (Sternglanz, pers. Mitteilung)
CTYVKG80 *ade2 trp1 leu2 his3 gal4 gal80 URA3::lexA op-lacZ LEU2::PGKp-VP16-KIGAL80::leu2* (Vollenbroich *et al.*, 1999)
 α **MZ4** *trp1-1 leu2 ura3 gal1* (Zitomer, pers. Mitteilung)
 α **MZ4-3** *trp1-1 leu2 ura3 gal1 gal3* (Vollenbroich *et al.*, 1999)
VWBR1B/81 *ura3 his leu2 trp1 gal80* (Kuger, pers. Mitteilung)
JD52 (Johnson *et al.*, 1995)
CTYVKG80-R10 *ade2 trp1 leu2 his3 gal4 gal80 URA3::lexA op-lacZ LEU2::PGKp-VP16-KIGAL80-R10::leu2* (diese Arbeit)

2.2.5 Medien, Anzucht und Lagerung von Hefestämmen

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte bei 30°C in Vollmedium (YEPD, 1% Hefeextrakt, 2% Peptone, 2% Glukose) bzw. in supplementiertem Minimalmedium (SM). Flüssigkulturen wurden zur besseren Belüftung kontinuierlich geschüttelt. Das Minimalmedium, bestehend aus 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) wurde mit einem Aminosäure/Basen-Mix [Adenin (2,4 g/l), Arginin (0,768 g/l), Histidin (0,4 g/l), Isoleucin (1,152 g/l), Leucin (0,6 g/l), Lysin (0,6 g/l), Methionin (0,768 g/l), Phenylalanin (0,96 g/l), Tryptophan (0,4 g/l), Threonin (1 g/l), Tyrosin (0,015 g/l), Uracil (0,4 g/l), Valin (1,152 g/l)] supplementiert. Bei der Herstellung der Minimalmedien wurde stets eine 20fache Stammlösung des jeweiligen Aminosäure-Mixes zugefügt. Für die Selektion auf Markergene wurde die entsprechende Aminosäure bzw. Base nicht zugesetzt. Als Kohlenstoffquellen dienen 2% Glukose, 2% Glukose und 2% Galaktose, 3% Glycerin oder 3% Glycerin und 2% Galaktose, 2% Glycerin mit 3% Lactat und 0,05% Glukose, 2% Glycerin und 3% Lactat, 2% Glycerin mit 3% Lactat und 2% Galaktose. Kulturen, die induziert werden sollten, wurden mit 2% Galaktose 20 min bei 30°C inkubiert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2% Agar zugegeben. Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert des SM-Agars auf 6,5 eingestellt. Für die Selektion von *K. lactis*-Transformanten, die Plasmide mit dem *KanMX4*-Modul exprimieren, wurde dem Medium Geniticin (G418-Sulfat) in einer Endkonzentration von 125 mg/l zugefügt. Zur Lagerung der Stämme wurden sie nach zwei Tagen Anzucht bei 30°C auf Platte bei 4°C aufbewahrt und nach zwei Monaten auf frisches Medium überimpft. Zusätzlich wurden Glycerinstocks der Hefestämme angelegt. Hierbei wurden je 500µl einer Flüssigkultur mit 500µl 100% Glycerin vermischt und bei -70°C aufbewahrt.

2.3 Plasmide

2.3.1 Ausgangsplasmide

- pADH1:** Das Plasmid enthält den *ScADH1*-Promotor als 1,8 kb *BamHI-EcoRI*-Fragment im pBluescriptKS(+) (Zenke *et al.*, 1996).
- pASV1:** Two-Hybrid-Vektor, trägt *LEU2*-Marker und die Promotor bzw. Terminationsregion des *PGK1*-Gens. Hier wurde die Sequenz des Kernlokalisationssignals des L29-Proteins aus Hefe sowie die Aktivierungsdomäne des viralen VP16-Transkriptionsfaktors hinein kloniert. Hochkopienzahl-Plasmid (Le Douarin *et al.*, 1995).
- pBTM116:** Two-Hybrid-Vektor, der den kodierenden Bereich für die DNA-Bindedomäne des bakteriellen *lexA*-Repressors unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors und das *TRP1*-Marker Gen enthält. Hochkopienzahl-Plasmid (Vojtek *et al.*, 1993).
- pCAG1:** *K. lactis*-Centromerplasmid mit *GAL1* aus *K. lactis* unter *ScADH1*-Promotorkontrolle (*EagI-Sall*-Fragment aus pAG1 in pKATUC4) (Zachariae, 1994).
- pCAG1-1C, -2C, -4C, -14, -18:** Derivate des pCAG1 mit den mutierten *K. lactis*-*gall1*-Allelen *gall1-1C, -2C, -4C, -14, -18* (Menezes, pers. Mitteilung)
- pE1:** *K. lactis*-Multikopie-Vektor mit *ScURA3*-Gen, welches das komplette pKD1-Plasmid aus *K. drosophilorum* enthält (Bianchi *et al.*, 1987)
- pEAG1:** *EagI-Sall*-Fragment aus pAG1 in pE1 (Zenke *et al.*, 1996)

pEAG1-1C, -2C, -4C, -14, -18:

Derivate des pEAG1 mit den mutierten *K. lactis-galli*-Allelen *gall-1C, -2C, -4C, -14, -18* (Menezes, pers. Mitteilung)

pKG1:

Derivat des Plasmids pFL38K, welches das *K. lactis GAL1* als 2,4 kb Fragment in einer einzigen *SmaI*-Schnittstelle enthält (Meyer *et al.*, 1991)

plxGal1:

Derivat des pBTM116, welches eine *lexA-GAL1*-Fusion unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors trägt, die durch Ligation von pBTM116 (*EcoRI/SalI*) mit einem *KIGAL1*-PCR-Produkt (*EcoRI/SalI*) entstanden ist. Hochkopienzahl-Plasmid (Vollenbroich, 1999).

plxGal1-m1, -m2, -14, -18, -209, -10d, -1C, -2C, -4C, -d:

Derivate des plxG1 mit den mutierten *K. lactis-galli*-Allelen *gall- m1, -m2, -14, -18, -209, -10d, -1C, -2C, -4C, -d* (Vollenbroich, 1999; Menezes, pers. Mitteilung)

pKATUC4:

K. lactis-Centromer-vektor mit *KICEN2-ARS1-KARS12-ScTRP1-ScURA3* (Zenke *et al.*, 1993)

pVKG80:

Two-Hybrid-Vektor, der die *VP16-KIGAL80*-Fusion hinter dem *PGK1*-Promotor trägt. Das Fusionsprodukt ist durch die Ligation des pASV1 (*XhoI/BglII*) mit einem *KIGAL80*-PCR-Fragment (*XhoI/BglII*) entstanden. (Vollenbroich, 1999).

pVKG80-S0, -S1, -S2, -R10:

Derivate des pVKG80 mit den mutierten *K. lactis-gal80*-Allelen *gal80- S0, -S1, -S2, -R10* (Vollenbroich, 1999; Menezes, pers. Mitteilung).

pYIplac128:

Ausgangsplasmid für die Integration des *GAL80-R10*-ORF in den Stamm CTY10-5d zur Generierung des Stammes CTYVKG80 (-R10).

pGREG546:

Plasmid der pGREG-Serie. Plasmid mit *GAL1*-Promotor vor *GST* mit multicopy-site für die Klonierung eines GST-Fusionsproteins; zudem geeignet für eine homologe Integration hinter dem *GST*-ORF mit einem *HIS*-Marker Gen, welches durch einen *SalI* Verdau entfernt wird. Weitere Marker zur Selektion sind ein *kanMX4*-Modul und das *URA3*-Marker-Gen für Hefen und ein Ampicillin Marker-Gen für *E.coli* (Jansen, pers. Mitteilung).

pGREG576:

Plasmid der pGREG-Serie. Plasmid mit *GAL1*-Promotor vor *GFP* mit multicopy-site für die Klonierung eines GFP-Fusionsproteins; analog zur pGREG546.

pGREG506myrGFP:

Plasmid der pGREG-Serie. Plasmid mit *GAL1*-Promotor vor *myrGFP* mit multicopy-site für die Klonierung eines GST-Fusionsproteins zur Immobilisierung von Proteinen an die Plasmamembran; analog zur pGREG546.

pGREG506myrGST:

Plasmid der pGREG-Serie. Plasmid mit *GAL1*-Promotor vor *myrGST* mit multicopy-site für die Klonierung eines myrGST-Fusionsproteins zur Immobilisierung von Proteinen an die Plasmamembran; analog zur pGREG546.

pEAHisG1:

K. lactis-Hochkopienzahl-Plasmid pE1 mit *ScADH1*-Promotor und wildtypischem *KIGAL1*, welches am 5'-Ende mit der Sequenz MRGS-6x His-Epitops modifiziert wurde. Der Promotor und das modifizierte

GAL1 wurden als 2,5 kb großes *EagI/SalI*-Fragment aus pAHISG1 in pE1 (*EagI/SalI*) ligiert (Engels, R., Dissertation 1999).

- pEKAHisG1:** *K. lactis*-Hochkopienzahl-Derivat von pEAHISG1-WT, welches das *kanMX4*-Modul aus pUG6 als 1619 bp großes *NotI*-Fragment in der Einzelschnittstelle *EagI* enthält (Engels, R., Dissertation 1999).
- pEAGHisG80:** *K. lactis*-Hochkopienzahl-Plasmid *KIGAL80* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors. Das 4 kb *EagI/XhoI*-Fragment aus pAG80 mit der *ScADH1*-Promotor-*KIGAL80*-Fusion wurde in das *EagI/SalI* geschnittene Hochkopienzahl Plasmid pE1 kloniert.

2.3.2 Plasmidkonstruktionen

pYIpVKG80-R10:

Integrationsplasmid zur Integration des *GAL80-R10* ORF in den Stamm CTY10-5d. Ein *HindIII/BglII* geschnittenes Fragment des Plasmids pVKG80-R10 mit *PGK*-Promotor, *L29/VP16*-Aktivierungsdomäne und dem *GAL80-R10*-Gen wurde ligiert mit dem Fragment des pYIplac128-Plasmids (*HindIII/BglII*).

pCGSTGal1: Variante der pGREG-Serie, ein PCR generiertes *GAL1*-Fragment aus dem Plasmid pEAG1 wurde über homologe Rekombination in das *SalI*-geschnittene Plasmid pGREG546 eingeführt.

pCGFPGal1: Variante der pGREG-Serie, ein PCR generiertes *GAL1*-Fragment aus dem Plasmid pEAG1 wurde über homologe Rekombination in das *SalI*-geschnittene Plasmid pGREG576 eingeführt.

pCmyrGSTGal1: Variante der pGREG-Serie, ein PCR generiertes *GAL1*-Fragment aus dem Plasmid pEAG1 wurde über homologe Rekombination in das *SalI*-geschnittene Plasmid pGREG506-myrGST eingeführt.

pCmyrGFPGal1: Variante der pGREG-Serie, ein PCR generiertes *GAL1*-Fragment aus dem Plasmid pEAG1 wurde über homologe Rekombination in das *SalI*-geschnittene Plasmid pGREG506myrGFP eingeführt.

pCAG1-m1, -m2, -22, -40, -209, -10d, -HY, -37, -42, -BB:

Derivate des pCAG1 mit den mutierten *K. lactis-gall*-Allelen *gall-m1*, *-m2*, *-22*, *-40*, *-209*, *-10d*, *-HY*, *-37*, *-42*, *-BB*.

plxGal1-22, -40, -HY, -37, -42, -BB:

Varianten des plxG1, diese tragen anstelle des wildtypischen *KIGAL1* ein durch PCR-Mutagenese entstandenes mutiertes Allel *gall-37* sowie *gall-40*, *gall-42*, *gall-HY*, welche über homologe Rekombination in plxG1 (*StuI/SpeI*) integriert wurden.

pVKG80(1-1077):

Variante des pVKG80, diese trägt eine 75%ige Deletion des C-Terminus. Das PCR-Fragment generiert mit den Oligonukleotiden CA01 hin und CA75 her, (*XhoI/BglII*) wurde über Ligation in den Vektor pVKG80 (*XhoI/BglII*) eingeführt.

pVKG80(1-733): Variante von pVKG80, diese trägt eine 50%ige Deletion des C-Terminus. Das PCR-Fragment generiert mit den Oligonukleotiden CA01 hin und CA50 her, (*XhoI/BglII*) wurde über Ligation in den Vektor pVKG80 (*XhoI/BglII*) eingeführt.

pVKG80(1-377): Variante von pVKG80, diese trägt eine 25%ige Deletion des C-Terminus. Das PCR-Fragment generiert mit den Oligonukleotiden

CA01 hin und CA25 her, (*XhoI/BglII*) wurde über Ligation in den Vektor pVKG80 (*XhoI/BglII*) eingeführt.

pVKG80(703-1404):

Variante von pVKG80, diese trägt eine 75%ige Deletion des N-Terminus. Das PCR-Fragment generiert mit den Oligonukleotiden CA100 her und CA-75 hin, (*XhoI/BglII*) wurde über Ligation in den Vektor pVKG80 (*XhoI/BglII*) eingeführt.

pVKG80(350-1404):

Variante von pVKG80, diese trägt eine 50%ige Deletion des N-Terminus. Das PCR-Fragment generiert mit den Oligonukleotiden CA100 her und CA-50 hin, (*XhoI/BglII*) wurde über Ligation in den Vektor pVKG80 (*XhoI/BglII*) eingeführt.

2.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide für *GAL1* Mutagenese:

Gal1-N hin	5' -gac tcc tat tg tgcc aac ag- 3'
Gal1-03	5' -ccc gaa ttc atg tcc gtt cct att g- 3'
Gal1-07	5' -ccc gaa ttc ttg gat ggg tcc ttg a- 3'
Gal1-09	5' -ccc gaa ttc aac ata ggt aag ggt a -3'
Gal1-N her	5' -cac cga cat gat gtt ccg cta c- 3'
Gal1-06	5' -ccc gga tcc tta agt ctt tgt caa- 3'
Gal1-10	5' -ccc gga tcc tta gtt agt tag ata t- 3'
Gal1-RE	5' -ccc gga tcc cta ttc ata taa gac- 3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung:

Gal1-CN	5' -ggt gac ctt cgt cag cag agc ttc acc att g- 3'
Gal1-C1	5' -gga cct gtc aat tat aat ttg aga g- 3'
Gal1-C2	5' -gcc ttc atc tgt gcg gtt tct ttg g- 3'

Oligonukleotide für die Umklonierung der *GAL1*- Basenaustausche:

Gal1-22 her	5' -gca ttg act gaa caa tat tgc aac ttg ag- 3'
Gal1-22 her	5' -gaa tac caa gag ttc ctc ggt ttg gca g- 3'
Gal1-V454	5' -gcc ggt tgg ggt ggt tgg aca cta cac tta tg- 3'
Gal1-F368	5' -cta act aac ttt cct gtt cgt tcc caa aga ttg- 3'
Gal1-M409	5' -ggt gcc cta atg agt gaa tgc cag g- 3'
Gal1-H379	5' -ggt att tca acg tgc taa gcg tgt tta ttc- 3'
Gal1-Y381	5' -ggt att tca acg tgc taa gca tgt taa ttc- 3'

Oligonukleotide für Klonierung der myr-Tag-Gal1-Derivate:

myrgal1 hin	5' -gaa ttc gat atc aag ctt act gat acc gtc gac aat gtc cgt tcc tta ttg tgc caa c- 3'
myrgal1 her	5' -gcg tga cat aac taa tta cat gac tgc agg tgc act tca tat aag aca cta ccc aga ctt gg- 3'

Oligonukleotide für die Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP)

UAS hin	5' -gcaggttgctggttatgatagcaac- 3'
UAS her	5' -ggt tct ttt ata gac ctt tgg aag cct gc- 3'
4kbUp hin	5' -cga cac cgt cag ttc tgg atc tgg ttg ttc- 3'
4kbUp her	5' -cca tgg tta ggt caa cag gag aaa cct gg- 3'
Fus1 hin	5' -gca gta gct cat tgg gag ttc aga gta gtc- 3'
Fus1 her	5' -cac cga atc tgg ctc atg ctg ttg cat att ttc- 3'

Oligonukleotide für GAL80-Deletionen:

CA01 hin	5' -ggc tcg aga caa taa caa acg gtc caa att atc c- 3'
CA-75 hin	5' -ggc tcgagg gta ttt gta cgt gga atg ggc tct tg- 3'
CA-50 hin	5' -ggc tcg agc tca aac aat atc cca act cag ttc c- 3'
CA-25 hin	5' -ggc tcg agc taa atc acc ttc tcc aag tac agg tac- 3'
CA100 her	5' -ggg aga tct ggt atg gat aca tag att tga ag- 3'
CA75 her	5' -ggg aga tct gta cct gta ctt gga gaa ggt g- 3'
CA50 her	5' -ggg aga tct caa tag gaa ctg agt tgg gat att g- 3'
CA25 her	5' -ggg aga tct caa gag ccc att cca cgt aca aat acc- 3'

Oligonukleotide zum Nachweis der GAL80-R10-Integration

KIGAL80-BgIII	5' -ggg aga tct ggt atg gat aca tag att tga ag- 3'
OUPV16	5' -ttt acc gat gcc ctt gga- 3'

2.5 Transformation

2.5.1 Transformation von *E. coli*

Elektroporation:

400 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 kultiviert. Die Kultur wurde dann für 15'-30' auf Eis inkubiert und anschließend in Falcon-Röhrchen für 15' bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit H₂O (erst 1 Vol., dann ½ Vol.) und einmal mit 1/50 Vol. 10% Glycerin gewaschen (alle Schritte auf Eis bzw. 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 10% Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt, welche dann bei -70°C gelagert wurden.

40 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl eines gefällten oder 1 µl eines 1:10 verdünnten Ligationsansatzes versetzt und in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite gegeben. Die Elektroporation erfolgt mit dem GenePulser™/Pulse Controller (Biorad, München) [1,6 kV; 25 µF; 200 Ohm]. Die Zellen wurden dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für ca. 30 - 45' bei 37°C auf dem Schüttler erholt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (13000 rpm, 2'), in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

RbCl₂-Methode:

Die Transformation von RbCl₂-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1983). Pro Transformation wurden 20-500 ng DNA mit 200 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen gemischt. Nach 20' Inkubation auf Eis, 45'' Hitzeschock (42°C) und erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30-45' bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie auf LB/Amp-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.5.2 Transformation von Hefen

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte nach der Gefrier-Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991).

Die Transformation von *K. lactis*-Stämmen erfolgte nach der gleichen Gefrier-Methode mit dem Unterschied, dass die verwendete Lösung A 0,6M KCl; 10mM Bicin, pH 8,35 und 3 % Ethylenglykol enthielt.

2.6 Präparation von Nukleinsäuren

2.6.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.6.1.1 Mini-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinen Mengen erfolgt nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Methode durch die alkalische Lyse. Dazu wurden 1,5 ml einer 2 ml Über-Nacht-Kultur bei 13000 rpm für 2' zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Zur Neutralisierung wurden die Ansätze dann mit 100 µl Puffer 3 (2,55 mM KOAc, pH 4,8) versetzt und für 15' bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96%igem Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.6.1.2 Midi-Präparation

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Plasmids „Midi-Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert.

2.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Zellen einer stationären Hefekultur (10 ml) wurden geerntet, gewaschen und in 1 ml Puffer 1 (entnommen aus dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Puffer 2 und 2/3 Volumen Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurden die Zellen 5 min mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. 1 ml Überstand wurde mit 0,5 ml Puffer 3 versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die DNA wurde anschließend für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.6.3 Präparation von genomischer DNA aus Hefe

Die Präparation der chromosomalen DNA erfolgte nach dem Protokoll von Fink (Fink *et al.*, 1983). Eine über Nacht angewachsene 5 ml Kultur wurde mit 20 ml H₂O gewaschen und bei 3000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde sie in 150 µl YML-Puffer1 resuspendiert (0,9 M Sorbit, 0,1 M EDTA, 14 mM β -Mercaptoethanol) und die Zellwand für 30 min bei 37°C mit 100T Zymolyase verdaut. Das Aliquot wurde danach bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl YML-Puffer2 (50 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Um die Proteine von der DNA zu trennen, wurde 25 µl 10% SDS hinzugegeben, und für 30 min bei 65°C inkubiert. Zum Fällen der DNA wurde im folgenden Schritt 75 µl 5M Kaliumacetat hinzugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit zwei Volumen 96% Ethanol versetzt, und ein weiteres Mal für 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 1 ml H₂O aufgenommen. Für PCR Analysen wurden 50 µl verwendet. Für präparative Analysen wurde die DNA anstatt mit 2 Volumen Ethanol mit einem Volumen Isopropanol versetzt.

2.7 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

2.7.1 Bestimmung der Konzentration mittels Spektralphotometrie

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt (Maniatis *et al.*, 1982). Dabei entspricht eine Extinktion $A_{260\text{nm}} = 1$ etwa 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ gibt die Reinheit der DNA an. Die Konzentration einzelsträngiger DNA wurde ausschließlich photometrisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht in diesem Fall 33 µg DNA /ml.

2.7.2 DNA-Konzentrationsabschätzung aus Agarosegelen

Die Bestimmung der Konzentration doppelsträngiger DNA erfolgte über Gelelektrophorese anhand des Vergleichs mit einem Konzentrationsstandard (KB-Leiter, Gibco).

2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 Restriktion von DNA

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den von den Herstellern angegebenen Pufferbedingungen und Temperaturen. Analytische Restriktionsansätze wurden in Volumina von 10-20 µl, präparative in 20-100 µl durchgeführt. Pro µg DNA wurden 1-10 U (Units) des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Zudem wurde bei analytischen Ansätzen RNase A in einer Endkonzentration von 100 ng/µl zugeführt. Die Restriktionsdauer betrug in der Regel 1-2 Stunden.

2.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit alkalischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers im mitgelieferten Puffer für 30 min bei 37°C.

2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden in der Regel Insert/Vektor-Verhältnisse von 2:1 bzw. bei sehr kleinen Inserts (~0,3-0,7kb) 10:1 angestrebt. Pro Ligationsansatz wurden 1U T4-Ligase (Gibco) und $\frac{1}{5}$ Vol. 5-fach Ligationspuffer zugesetzt. Die Ligation erfolgte meist über Nacht bei 16°C oder über Tag bei Raumtemperatur für etwa 3 Stunden.

2.8.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der Computerprogramme Chromas 2.0, ClustelX, Genedoc (Multiple Sequence Aligment Editor & Shading Utility Version 2.6.001) bearbeitet.

2.8.5 Auffüllung von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment

Das Klenow-Enzym ist ein Fragment der DNA-Polymerase I (*E. coli*) ohne 5'→3'-, aber mit 3'→5'-Exodesoxyribonuklease-Aktivität. Das Auffüllen von 5'-Überhängen erfolgte durch Zugabe von 2U Klenow-Fragment (Boehringer) pro µg DNA und den vier Desoxyribonukleotiden in Endkonzentrationen von jeweils 0,25 mM zu dem jeweiligen Verdauungsansatz. Nach Inkubation für 2h bei 37°C wurde das Enzym durch Inkubation für 10 min bei 75°C Hitze-inaktiviert.

2.8.6 T4-Polymerase Reaktion

T4-Polymerase hat ähnliche Eigenschaften wie das Klenow-Fragment, jedoch ist die 3'→5'-Exodesoxyribonuklease-Aktivität um etwa einen Faktor 200 höher. Dieses Enzym wurde alternativ zum Klenow-Fragment für Auffüllreaktionen eingesetzt (New England Biolabs), wobei 2U pro µg DNA sowie die vier Desoxyribonukleotide zum Restriktionsansatz hinzugegeben werden, welcher dann für 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

2.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten (elektroph.)

DNA-Fragmente wurden in 0,8-1,5%tigen Ethidiumbromid-haltigen (50 ng/ml) Agarosegelen bei 80-150 V/cm aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (50x TAE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l mit H₂O bideist) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Die DNA-Proben wurden für den Gellauf mit ¹/₁₀Vol. 10-fach konzentriertem Ficoll-SDS-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kB DNA-Leiter der Firma Gibco BRL.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR erfolgte nach dem Protokoll von Inis *et al.* (1990) mit dem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) und Thermocycler (Techne). Die Reaktion erfolgte in 50- bzw. 100 µl-Ansätzen.

Die PCR-Reaktionen wurden je nach Applikation (qualitativer-, quantitativer Nachweis oder Grösse der zu amplifizierenden DNA) mit dem PCR-Expand-Long-Kit und dem PCR-High-Fidelity-Kit der Firma Boehringer (Mannheim) oder mit der Taq-Polymerase der Firma Biomaster nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Aufreinigung der Produkte, erfolgte zum einen mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Qiagen, Hilden) und zum anderen mit dem Qiaex II Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden), nachdem die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt wurde gemäß den Angaben des Herstellers. Alternativ wurde mittels der Phenol/Chloroform-Extraktion aus Low-Melting-Gelen die DNA aufgereinigt

2.10.2 Zellkolonie-PCR für den Integrationsnachweis

Um die Integration von DNA-Fragmenten in das Genom der Hefe *S. cerevisiae* und *K. lactis* nachzuweisen, wurden ganze Zellen mit Hilfe der PCR-Technik nach der modifizierten Methode von Wang *et al.*, 1996, analysiert. Dazu wurde mit Hilfe eines Zahnstochers eine kleine Menge einer frisch gewachsenen Hefe-Kolonie am Boden

eines Eppendorf-Gefäßes ausgestrichen und dieses Gefäß 5 min bei 300 W in einer Mikrowelle inkubiert. Die Reaktion erfolgte dann in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

2.10.3 „random-PCR-Mutagenese“ (zufallsgerichtet)

Die zufallsgerichtete Mutagenese des *GALI*-Gens wurde mit der Taq-Polymerase, die nicht über eine Endonuklease-Aktivität zur Korrektur falsch eingebauter Nukleotide verfügt, durchgeführt. Um die Mutageneserate zu erhöhen, wurde im PCR-Ansatz das Basenanalogen dITP (10 mM) und jeweils eines der vier Nukleotide im Unterschuss (1 mM statt 10 mM) zugesetzt. So wurde anstelle der zu gering konzentrierten Base, dITP eingebaut. Dies hatte zur Folge, dass bei erneuter Synthese des DNA-Stranges eine der verbleibenden Basen eingebaut wird, da dITP mit allen Basen Wasserstoffbrücken eingehen kann. Die mittels PCR erhaltenen mutierten DNA-Fragmente von *GALI* wurden *in vivo* über homologe Rekombination in den linearisierten Ausgangsvektor plxG1 in das wt-*GALI*-Gen integriert.

2.11 Herstellung von Zellextrakten

2.11.1 Herstellung von analytischen Proteinextrakten mittels Glasperlen

Alle Schritte der Aufarbeitung erfolgten bei 4°C oder unter Eiskühlung.

5-50 ml einer exponentiell gewachsenen Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 für die Herstellung von Rohextrakten für Enzymtests oder Western-Analysen geerntet und die Zellen bei 4°C 5 min mit 3000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml eiskaltem Puffer (variiert je nach anschließender Methode) einmal gewaschen und in 300 µl des jeweiligen Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in Plastik Gefäßen, um die Adsorption des Proteins an der Wandung von Glas-Gefäßen zu vermeiden. Nach Zugabe des gleichen Volumens (max. bis knapp unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus) an Glasperlen wurden die Zellen 10-20 min bei 2200 rpm im Vibrax Typ VX2 (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) durch die Scherkräfte aufgebrochen. Zur Abtrennung restlicher Zellbestandteile wurden die Aufschlüsse in Eppendorf-Gefäße überführt und 10 min bei 10000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden in frische Eppendorf-Gefäße pipettiert. Der Proteinrohextrakt wurde dann für Enzymtests oder Phosphorylierungsexperimente unbehandelt eingesetzt. Für Western-Analysen wurden die Rohextrakte im gleichen Volumen mit Probenpuffer (2,5 % Bromphenolblau, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 125 mM Tris/HCl pH 6,8) versetzt und 10 min bei 95°C gekocht.

2.11.2 Herstellung von analytischen Proteinextrakten aus *E. coli*

Eine exponentielle *E. coli*-Kultur wird bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 für die Herstellung von Rohextrakten geerntet und bei 4°C 10 min mit 13000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 20 ml eiskaltem Puffer (variiert je nach anschließender Methode) einmal gewaschen und in 300 µl des jeweiligen Puffers resuspendiert. Die Suspension wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend läßt man die Suspension in dem Eppendorf-Gefäß wieder bei RT auftauen und wiederholt dies 5-10 Mal. Zur Abtrennung restlicher Zellbestandteile wurden die Aufschlüsse in frische Eppendorf-Gefäße überführt und 10 min bei 10000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden wiederum in frische Eppendorf Gefäße pipettiert. Der Proteinrohextrakt wurde dann für Enzymtests oder Phosphorylierungsexperimente unbehandelt eingesetzt.

Für Western-Analysen wurden die Rohextrakte im gleichen Volumen mit Probenpuffer (2,5 % Bromphenolblau, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 125 mM Tris/HCl pH 6,8) versetzt und 10 min bei 95°C gekocht.

2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976)

Für die Protein-Konzentration wurden nach den Angaben des Herstellers 10-50 µl der Proteinlösung in 800 µl H₂O verdünnt und dann die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay Dye Reagent, BioRad, München) gestartet. Nach 10 min Inkubation bei RT konnte die Extinktion bei 595 nm in einem Beckmann DU 7400 Photometer gemessen werden. Als Proteinstandard diente eine BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) bekannter Konzentration (0,5- 12 µg/µl).

2.13 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.13.1 β-Galaktosidase Enzymtest mit Flüssigkulturen

Quantitative Bestimmungen von β-Galaktosidase-Aktivitäten erfolgten mittels der ONPG-Messung. 5-10 ml Medium wurden mit dicht gewachsenen Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 3000 rpm für 10 min. wurde das Zellpellet einmal mit 20 ml LacZ-Puffer (50 mM Na-P-Puffer pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄) gewaschen und dann in 300 µl LacZ-Puffer aufgenommen. Nach Überführung der Suspension in ein kleines Reaktionsgefäß wurden Glasperlen (Ø 0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit hinzugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Vibrax (Janke & Kunkel 6 min; 4°C; 2200 rpm). Das Zell-Lysat wurde entnommen und für 10 min bei 10000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde direkt für die Aktivitätsmessungen und Proteinbestimmungen eingesetzt.

Die Aktivitätsmessung erfolgte in Plastik-Küvetten über einen Zeitraum von 3 min und alle 30 sek wurde die OD₄₉₀ gemessen, um ΔA/min zu ermitteln. 1 ml ONPG-Lösung (4mg/ml lacZ-Puffer) wurden mit verschiedenen Verdünnungen der löslichen Fraktion gemischt.

Die Berechnung der spez. Aktivitäten erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\Delta A_{420\text{nm}} \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}} \quad (\text{munits/mg})$$

ΔA _{420nm} :	Extinktion im Verlauf von einer Minute bei 420 nm
ε:	Extinktionskoeffizient für ONPG (0,0045/mM·cm)
d:	Schichtdicke (1cm)
V:	Gesamtvolumen
v:	Probenvolumen

2.13.2 β-Galaktosidase-Enzymtest durch X-Gal-Überschichtungstest

Die halbquantitative Messung der β-Galaktosidase-Aktivität von Hefe-Stämmen wurde mittels eines X-Gal-Überschichtungstest auf einer mit Hefestämmen gewachsenen Agarplatte (nach Suckow & Hollenberg, 1998) durchgeführt. Die Stärke der erzielten Blaufärbung diente als Maß für die β-Galaktosidase-Aktivität. Dazu wurden pro

Überschichtung 50 mg Agarose in 5 ml H₂O aufgekocht und mit 5 ml 1M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) versetzt. Nach kurzer Inkubation in einem 70°C Wasserbad wurden 100 µl einer 20%igen SDS-Lösung sowie 200 µl X-Gal-Lösung (10 mg/ml Dimethylformamid) hinzugegeben. Die Platten wurden nun vorsichtig mit dieser Lösung überschichtet und bis zum Erstarren der Agarose ruhig bei RT stehen gelassen. Die enzymatische Reaktion fand bei 30°C statt und war in der Regel nach 24h abgeschlossen (nach Suckow & Hollenberg, 1998).

2.13.3 X-Gal-Filtertest zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität

Um in einem Two-Hybrid-Phänotyp-Screen sehr viele Kolonien (~10000) testen zu können, diente zum alternativen Nachweis der bakteriellen *lacZ*-Genexpression in Zellkolonien der Nachweis durch einen Filtertest. Die Hefen wurden auf Glukose-Platten angezogen und dann frisch auf Glukose- bzw. Glukose/Galaktose-Platten replikaplatziert. Nach einem Tag Wachstum bei 30°C wurden Nylonrundfilter (Hybond-N) auf die Agarplatten mit den Kolonien gelegt und nach gleichmäßiger Durchfeuchtung vorsichtig transferiert und die Zellen durch Eintauchen des Filters für 10-15 sek in flüssigen Stickstoff aufgeschlossen. Anschließend wurde der Filter auf einer mit Whatmanpapier ausgelegten Petrischale mit 2,5 ml lacZ-Puffer und 2mg X-Gal/Platte angefeuchtet und für 30-120 min bei 30°C inkubiert.

2.13.4 Bestimmung der Galaktokinase-Enzymaktivität (nicht radioaktiv)

Dieser optische Test wurde 1936 von Otto Warburg eingeführt und basiert auf der Tatsache, dass reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotide (NADH und NADPH) Licht mit einem Maximum zwischen 338,5 und 340,5 nm absorbieren, während die oxidierten Formen (NAD und NADP) keine Absorption zwischen 300 und 400 nm zeigen. Jede Dehydrogenase-Reaktion, bei der NAD reduziert oder NADH oxidiert wird, kann durch die Registrierung der Extinktionszunahme bzw. -abnahme bei 340 nm oder einer nahegelegenen Wellenlänge gemessen werden (ϵ : 0,0063/mM·cm). Bei der Phosphorylierung von Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat durch die Galaktokinase kann die Abnahme von ATP zu ADP durch Kopplung dieser Reaktionen an zwei weitere Hilfsenzyme und Oxidation von NADH zu NAD⁺ bei 340 nm photometrisch (Beckman-Photometer DU 7400) verfolgt werden. Dabei wird das durch GalI gebildete ADP durch die Pyruvatkinase (PK, E.C.2.7.1.40) und Phosphoenolpyruvat als Substrat zu ATP regeneriert und Pyruvat gebildet. Das entstandene Pyruvat wird mit Hilfe der L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH, E.C.1.1.1.27) und NADH zu L-Lactat reduziert. Zur Bestimmung der GalI-Aktivität und der K_m -Werte für Galaktose und ATP wurde die Extinktionsabnahme bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 min in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bei 30°C gemessen. Der Messpuffer enthielt stets 100 mM Tris/HCl, pH 7,9; 1mM DTT; 3,2 mM NaF; 300 µg/ml BSA; 5 mM MgCl₂; 1 mM Friktose-1,6-bis-Phosphat; 0,23 mM NADH; 2 mM Phosphoenolpyruvat und 0,9 U/ml von jedem Hilfsenzym (PK und L-LDH). Die Hilfsenzyme (Roche, Mannheim) wurden als NH₄sulfat-Suspension geliefert und vor jedem Test frisch in Galk-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,9; 1mM DTT; 3,2 mM NaF; BSA 300 µg/ml) verdünnt. Die Messung erfolgte zunächst 2 min bei 30°C ohne Substratzugabe. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe der Substratlösung (Galaktose: 0,2-20 mM, ATP: 0,2-2 mM) gestartet und über einen Zeitraum von 8 min photometrisch verfolgt.

Die Berechnung der spez. Aktivitäten erfolgte analog zur Formel auf S.22:

2.14 Dephosphorylierung von Proteinen

50 µl Proteinextrakt oder aufgereinigtes Protein wurden mit 5 µl alkalischer Phosphatase (CIP, 1 U/µl) versetzt. Jeweils eine Protein-Probe wurde mit Phosphatase behandelt und für 4 h bei 37°C inkubiert, eine zweite Probe wurde ohne Enzymzugabe für 4 h bei 37°C inkubiert und eine dritte ebenfalls ohne Enzymzugabe für 4 h auf Eis aufbewahrt. Nach der Phosphatasebehandlung wurden die Proteinproben für eine Western-Analyse aufbereitet.

2.15 Auftrennung und Nachweis von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (1970) als diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt, wobei die Polyacrylamid-Gele aus einem 3%igen Sammelgel (Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS) und einem 7,5-15%igen Trenngel (Trenngelpuffer: 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS) besteht. Das Trenngel wurde vor dem Auspolymerisieren mit n-Butanol oder Isopropanol überschichtet, um die Reaktion mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "HMW-Prestained"-Marker (Sigma) und die BenchMark-Prestained Protein Ladder (Invitrogen) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einer Hoefer-Kammer 12-16 h über Nacht bei 40-50 V bzw. vier Stunden über Tag bei 100-200 V oder in einer BioRad Minigelkammer 1 h über Tag bei 100-200 V mit Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS).

2.15.1 Coomassie-Färbung

Proteine können direkt im Gel angefärbt werden. Dazu wird das Gel nach dem Lauf zunächst in eine Färbelösung (7,5% Essigsäure, 50% Methanol, 0,1% Coomassie-Brilliant-Blue) bis zur Farbsättigung eingelegt und dann bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt (Entfärbelösung: 7,5% Essigsäure, 20% Methanol). Alle Schritte wurden bei RT gemacht.

2.15.2 Silber-Färbung

Eine ebenfalls häufig eingesetzte Methode zur Untersuchung des Reinheitsgrades von aufgetrennten Proteinen ist die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987). Diese Methode beruht auf der Komplexbildung der Ag^+ -Ionen mit Glu- Asp- und Cys-Resten der Proteine und deren Reduktion zu metallischem Silber in Anwesenheit von alkalischem Formaldehyd. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine in Nanogramm-Mengen nachgewiesen werden (5-30 ng/Proteinbande).

Dazu werden die Proteine nach dem Gellauf zunächst für mindestens zwei Stunden im Gel fixiert (Fixierlösung: 50% Methanol, 12% Essigsäure, Formaldehyd 0,5 ml/l), das Gel 3 x 20 min in 50% Ethanol, danach 1 min in Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l) gewaschen und für 20 min in eine Silbernitratlösung in Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels (Silbernitrat 2g/l; Formaldehyd 0,75 ml/l) eingelegt. Das Gel wurde danach 3 x 2 min mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in einer Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3 60 g/l; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,8mg/l; Formaldehyd 0,5 ml/l). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung (50% Methanol; 12% Essigsäure) beendet. Das Gel konnte dann auf Whatman-Papier getrocknet werden.

2.16 Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine („Western-Analyse“)

2.16.1 Elektroblob

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Immobilon P, Millipore). Die Membran wurde zur Erhöhung der Affinität der Oberfläche zunächst 10 sek in Methanol gewaschen, dann in Wasser gespült und in Transferpuffer (1x Laufpuffer; 20% Methanol) bis zum Blotaufbau aufbewahrt. der Elektrotransfer erfolgte bei 4°C 1,5- 2 h bei 50 V oder bei 40 V über Nacht.

2.16.2 Detektion der filtergebundenen Proteine

Nach dem Elektrotransfer wurde die PVDF-Membran 1 h in PBSTB (10x PBS: 100mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 1,5 M NaCl) (PBSTB: 1x PBS; 0,1% Tween 20; 3% BSA) inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation (1-2 h oder über Nacht) mit dem primären Antikörper (bis zu 1:10000 verdünnt, je nach Antikörper). Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x 10 min Waschen mit PBST (1x PBS; 0,3% Tween 20) entfernt. Die Membran wurde dann für 2 Stunden mit dem in PBSTB 1.10000 verdünnten sekundären Antikörper inkubiert und anschließend erneut 3 x 10 min mit PBST gewaschen. Zur Entwicklung der Membran wurde diese zunächst in DIG-P3 Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) equilibriert. Die Entwicklung erfolgte in der Färbelösung (7 mg BCIP in 50 ml DIG-P3 Puffer + 50 mg NBT gelöst in 500 µl 70%igen DMF) bis zur gewünschten Färbung. Die Färbereaktion wurde durch Waschen der Membran in TE-Puffer (Maniatis) oder in Wasser gestoppt. Die Membran konnte dann auf Whatman-Papier getrocknet werden.

2.16.3 Entfernung von Antikörpern an filtergebundenen Proteinen

Mittels des sogenannten „stripping“-Verfahrens können Antikörper, die an membrangebundene Proteine binden, entfernt werden. So ist es möglich, eine Membran mit verschiedenen Antikörpern zu entwickeln. Dazu wurde die Membran nach der ersten Entwicklung für 2-5 min in Lösung A (0,2 M Glyzin pH 2,8; 0,5 M NaCl) inkubiert und anschließend für 2 min mit 1 M NaOH neutralisiert.

Nach dieser Behandlung, bei der die Farbsignale auf der Membran erhalten bleiben, jedoch die Antikörper entfernt werden, kann die Membran, wie oben beschrieben, erneut entwickelt werden.

2.17 „Southern-Analyse“ von genomischer DNA

Für die Analyse von Rekombinationsereignissen wurde genomische DNA aus Hefe nach der in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Methode präpariert. 5 µl der DNA wurde mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 20 µl in Gegenwart von RnaseA (Endkonzentration 0,1 µg/µl) geschnitten. Die genomische DNA wurde in 0,8-1%igen Agarosegelen aufgetrennt und auf Hybond N-Nylonmembran mittels Vakuumblob (LKB 2016, VacuGene, Pharmacia) transferiert. Dazu wurde das Gel bei einem konstanten Vakuum von 40 cm Wassersäule nacheinander 5 min mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) 5 min mit Neutralisierungslösung (3 M Natriumacetat) und für 30 min mit 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat) überschichtet. Die transferierte DNA wurde mit UV-Licht (254 nm, 3 min) auf der Membran fixiert und diese bis zur weiteren Verwendung trocken aufbewahrt. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgte mit gelabelten DANN-Sonden. Hier wurden zwei

verschiedene Alternativen verwendet: A) mit dem DNA Labeling Kit der Firma Roche gemäß Herstellerangaben und B) via PCR Amplifikation. Hierzu wurde DIG gelabeltes dUTP im Unterschub dem PCR Ansatz hinzugegeben. Für den Standard wurde die Methode A) verwendet. 1 µl Kb-Leiter DNA wurden im Wasserbad gekocht, um die DNA-Doppelstränge zu trennen. Um eine Renaturierung zu verhindern, wurde der Ansatz auf Eis/Ethanol abgekühlt und mit 2 µl Klenow-Enzym (100 U/ml) und gelabelten dNTPs versetzt. Die folgende Inkubation von 20 h bei 37°C wurde mit 2 µl EDTA gestoppt. Für die Detektion wurde ein modifiziertes Detektions-Protokoll mit Maleinsäure-Puffer verwendet. Die Hybride wurden durch „Enzym-linked Immunoassay“ unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin-Alkalisches Phosphatase-Konjugat, Roche) mit NBT/BCIP detektiert.

2.18 Immunfluoreszenz-Analyse

Zur Immunfluoreszenz-Analyse wurden 5 ml einer sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Kultur durch 5 min Zentrifugation bei 3000 rpm geerntet und mit 500 µl 1 M KPO₄ und 500 µl frisch angesetztem Formaldehyd über 120 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 3200 rpm abzentrifugiert und in 1 ml Spheroblastenpuffer (0,1 M K₂PO₄, pH 7,5; 1,2 M Sorbitol, 0,5 mM MgCl₂) resuspendiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Spheroblastenpuffer aufgenommen. Um die Zellwand anzudauen, wurden die Zellen mit 1,4 µl β-Mercaptoethanol (1:700) und 10 µl Zymolyaselösung (100 T) versetzt und für 15-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spheroblasten wurden 1-2 Mal mit kaltem SP-Puffer gewaschen und abhängig von der Pelletgröße in 100-500 µl Spheroblastenpuffer aufgenommen. Zur Fluoreszenzmakierung mußten „Multitest-Objekträger“ (Dunn Labortechnik GmbH) vorbereitet werden. Sie wurden mit H₂O dest. gewaschen, getrocknet und anschließend mit Polylysin (20 µl pro Aussparung) für 10 min bei 30°C inkubiert. Abschließend ließ man nach einem erneuten Waschschrift mit H₂O dest die „Multitest-Objekträger“ vollständig trocknen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter Bedingungen höherer Luftfeuchtigkeit durchgeführt, um die „Multitest-Objekträger“ nicht austrocknen zu lassen. 20 µl der Zellen wurden pro Vertiefung hinzugegeben und für 10 min inkubiert. Nachfolgend wurden 2 Waschschrte mit PBS (10 mM Na-P-Puffer, pH7,2; 150 mM NaCl) durchgeführt. Mit 20 µl PBS-BL (50 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, 1% BSA, pH7,5) wurden die Spheroblasten für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit spezifischem Antikörper, (verdünnt in PBS-BL 1:200-500), wurde die Spheroblasten in 20 µl pro Vertiefung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde viermal mit PBS gewaschen. Mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Diavona), wurde in PBS-BL 1:500-1000 verdünnt, und zu je 20 µl pro Vertiefung für ein bis zwei h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder vier Waschschrte mit PBS. Die „Multitest-Objekträger“ wurden getrocknet und mit 3-5 µl Mounting Medium (100 mg p-Phenylendiamin in 10 ml PBS, pH8,5 ad 100 ml Glycerin) überschichtet. Mit einem Deckglässchen wurde der Ansatz versiegelt und unter Verwendung geeigneten Filtersätzen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioscope) betrachtet.

2.19 Anfärbung der DNA mit DAPI (4,6- Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid)

Für die Anfärbung der DNA mit DAPI wurden die Zellen mit Formaldehyd (Endkonzentration 4%) für 30 min bei 30 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 1 ml 1x PBS gewaschen und in einem geeigneten Volumen 1x PBS aufgenommen. Zu den Aliquots wurde DAPI in einer Endkonzentration von 50 ng/ml hinzugegeben. Die Zellen wurden auf ein mit Poly-Lysin behandeltes Deckgläschen gegeben und mit Mounting-Lösung überschichtet. Mit einem Deckglässchen wurde der

Ansatz versiegelt und unter Verwendung eines Rhodamin-Filters mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioscope) betrachtet.

2.20 Affinitätschromatographie-Systeme

Die Chromatographieläufe mit Ni NTA-Agarose (IMAC) erfolgte bei 4°C mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammelsystems (Gradi-Frac: Amersham-Pharmacia, Freiburg). Fraktionen mit einem Volumen von 10 ml konnten in Reagenzgläsern, Fraktionen mit einem Volumen von 1ml konnten in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen werden.

2.20.1 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

Für die selektive Protein-Aufreinigung von His-getagten Fusionsproteinen aus *K. lactis* wurde die Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammel-Systems (Gradi-Frac: Amersham-Pharmacia, Freiburg). Rohextrakte aus einer 6 l Kultur wurden für 2h bei 45000 rpm (150000x g), 4°C mit einem Ti 55.2-Rotor in der Beckman Ultrazentrifuge geklärt und mit Cell-Puffer (20 mM HEPES/NaOH, pH, 8,0; 350 mM NaCl, 10 % Glycerin (w/v); 0,2 % Tween 20 (w/v), 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Imidazol) ad 60-80 ml aufgefüllt. Diese wurden auf 2-6 ml Säulenmaterial (equilibriert mit Aufschluss-Puffer: 20 mM HEPES/NaOH, pH 8,0; 350 mM NaCl; 10% Glycerin (w/v); 0,2 % Tween 20 (w/v), 1 mM PMSF; 1 Complete-EDTA-free-Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette) in einer Säule mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Flußrate von max. 0,5 ml/min aufgeladen. Anschließend wurde die Säule mit dem 40fachen Säulen-Volumen gewaschen und danach das Protein unter nativen Bedingungen eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 1 l Dialyse-Puffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2; 100 mM NaCl; 0,1 mM ATP; 5 mM $MgCl_2$) in Dialyse-Cassetten (Fa. Pierce) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde weitere 2 h gegen frischen Dialyse-Puffer dialysiert. Mit Tropfgeschwindigkeit wurde die dialysierte Proteinlösung auf die Affigel-Blue-Säule geladen.

2.20.2 AC-Affinitätschromatographie mittels Affigel-Blue

Die Reinigung der Galaktokinase Gal1 und des transkriptionellen Repressors Gal80 mit Säulenmaterial, an denen ein Nukleotid-ähnlicher Farbstoff-Ligand immobilisiert ist, wurde analog zu dem Protokoll für die Reinigung der Phosphofruktokinase aus *S. cerevisiae* von Kopperschläger und Johansson (1982) durchgeführt. Die Dialysefraktionen wurden auf die Säule geladen. Die Säule bestand aus einer 1 ml Plastikpipettenspitze mit einem Pfropfen Glaswolle, die mit 1 ml Affigel-Blue-Matrix gefüllt wurde. Sowohl die Plastikpipettenspitze, als auch das Säulenmaterial wurde vor dem Beladen jeweils mit 5 ml Dialyse-Puffer equilibriert. Diese Spitze konnte auch durch ein kurzes Schlauchstück verlängert werden und mit Hilfe einer Klemme verschlossen werden. Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml wurden in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen und dann alle gebundenen Proteine in einer Schlagelution mit dem gleichen Puffer und 1 M NaCl eluiert. Gal1 konnte schon vor der Schlagelution aufgefangen werden, da es nicht an der Säule gebunden hat. Gal80 hingegen wurde durch die Schlagelution eluiert und konnte in den letzten Fraktionen gesammelt werden. Ohne die Verwendung dieser Säule sind alle Kristallisationsansätze mit Gal1 ausgefallen. Anschließend wurden die aufgefangenen Elutionen vereinigt und über Centricon 30 in Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 25% Glycerin) überführt.

2.20.3 Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose

Für die selektive Protein-Aufreinigung von GST-getaggtten Fusionsproteinen aus *S. cerevisiae* und *E. coli* wurde die Affinitätschromatographie mittels Glutathion Sepharose durchgeführt. Zur Aufreinigung mußte die Sepharose zunächst aufgearbeitet werden. 1,33 ml der 75%igen Gultathion Sepharose wurde bei 500x g mit 10 ml 1x PBS Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml 1x PBS Puffer aufgenommen. Die daraus resultierende Lösung entspricht einer 50%igen Suspension, die so konzentriert zur Aufreinigung GST-getaggtter Proteine verwendet werden konnte. Zellextrakte aus *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden mit etwa 0,2 Volumen 50%iger Sepharose versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose 3 x mit 40 ml 1x PBS Puffer mit 1% TritonX, 1 x mit 10 ml 1x PBS Puffer und 1x mit 1,5 ml 1 x PBS Puffer gewaschen. Die Elution der an die Glutathion Sepharose gebundenen Protein erfolgte mit 0,8 ml Volumen Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) bei RT für 10 min. Die eluierten Proteine wurden dann 2 x 2 h gegen 20% Glycerin in 1 x PBS Puffer dialysiert und konnten dann bei -70°C aufbewahrt werden.

2.20.4 Proteinanreicherung und Immobilisierung über ProteinA-coated Latex-Beads

Für die selektive Proteinanreicherung mit spezifischen Antikörpern aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* wurde die Affinitätschromatographie mittels ProteinA ge-coated Latexbeads (Sigma) durchgeführt. Zur Aufreinigung von Proteinen aus Rohextrakten mit spezifischen Antikörpern mußten zunächst die Latexbeads mit ProteinA überschichtet werden. Antikörper binden mit hoher Affinität an ProteinA und können daher zur selektiven Proteinanreicherung verwendet werden. 20 µl Latexbeads wurden zunächst mit 1 ml 1 x PBS Puffer gewaschen. Mit 1 ml Coupling-Puffer erfolgte ein zweiter Waschschritt der Latexbeads, die dann in 100 µl Coupling-Puffer aufgenommen wurden. Der komplette Ansatz wurde anschließend mit ProteinA (1 mg/ml) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde dem Ansatz weitere 500 µl Coupling-Puffer zugefügt und mit Ultraschall im Wasserbad für 5-10 min behandelt. In einem weiteren Schritt wurde der Latexbead-Suspension dann 20-40 mg/ml BSA hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Mit 1 x PBS Puffer mit 10 mg/ml BSA wurde die Suspension gewaschen und in 1 ml 1 x PBS mit BSA (0,2 mg/ml) aufgenommen.

Zur Kontrolle, ob das ProteinA an die Latexbeads gebunden hatte, erfolgte eine Sichtung mit ProteinA-Antikörpern, die das ProteinA auf den Latexbeads erkennen, die ihrerseits durch einen sekundären Antikörper gekoppelt an FITC, unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Hierzu wurden 100 µl der Latexbeads, ge-coated mit ProteinA mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Die Beads wurden dann mit 3,7% Formaldehyd in 1 x PBS mindestens 1 h bis maximal 20 h fixiert. Folgend wurden die Beads dann 3 x mit 150 µl 1 x PBS gewaschen und mit 1 µl ProteinA-Antikörper versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten weitere drei Waschschritt mit 150 µl 1 x PBS und eine weitere Inkubation mit 1 µl sekundärem Antikörper gekoppelt an FITC, der den ProteinA-Antikörper erkennt. Nach einem Waschschritt mit 1 ml 1 x PBS Puffer und 2 x mit 100 µl 1 x PBS Puffer erfolgte die Sichtung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Nach positiver Sichtung wurden Proteinrohextrakte mit spezifischen Antikörpern versetzt und über Nacht bei 4°C in einem Volumen von 3ml inkubiert. Diese Ansätze wurden dann mit 300 µl Latexbeads, ge-coated mit ProteinA vermischt und für weitere 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (10 min 12000 rpm) und zwei Waschschritten mit zum einen 1 ml 1 x PBS Puffer und zum anderen 500 µl 1 x PBS Puffer konnten die so angereicherten Proteine an den Latexbeads für Bindungsexperimente verwendet werden.

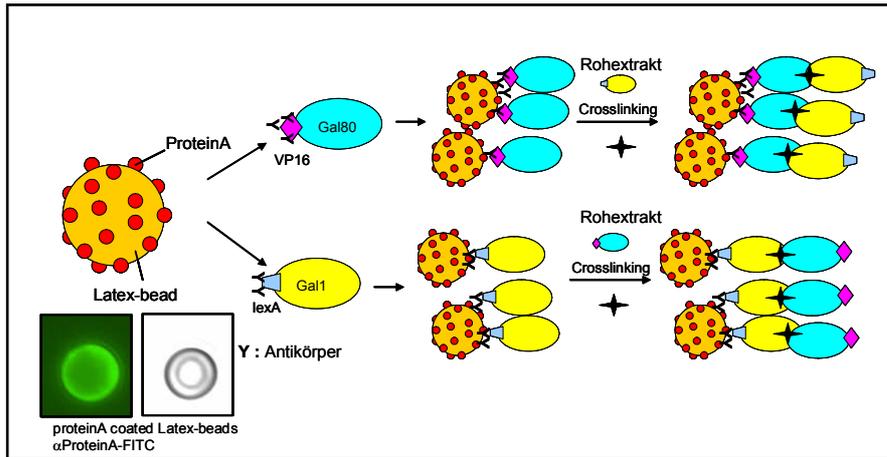


Abbildung 2.1
Aufreinigung über ProteinA coated Latexbeads und anschließender Bindungsstudie. Die Kontrolle der Latexbeads erfolgte über FITC-gekoppelte Antikörper gegen ProteinA

2.21 Konzentrierung, Entsalzung und Pufferwechsel von Proteinlösungen

2.21.1 Ammoniumsulfat Fällung

Das Aussalzen von Proteinen durch Zugabe von gemörsertem Ammoniumsulfat-Salz zu der auf Eis rührenden Protein-Lösung erfolgte nach dem Protokoll für die Aufreinigung der Galaktokinase aus *S. cerevisiae* (Wilson *et al.*, 1982). Während die Galaktokinase aus *S. cerevisiae* in einem ersten Fällungsschritt bei einer Sättigungskonzentration von 2 M im Überstand verbleibt, kann das Protein nach einem Zentrifugationsschritt durch Zugabe von 0,9 M Ammoniumsulfat (Endkonzentration: 3,1 M) gefällt werden. Das Proteinpellet wurde nach der Zentrifugation durch langsames Schütteln langsam zurückgelöst.

2.21.2 Dialyse

Die Dialyse von Protein-haltigen Fraktionen wurde im Dialyseschlauch der Fa. Serva nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Dialyseschlauch wurde zunächst in 500 ml 1 mM EDTA für 10 min bei 95°C ausgekocht und nach der Equilibrierung in dem eiskalten Dialysepuffer mit der Proteinlösung beladen. Die Dialyse erfolgte über Nacht gegen 1 l Puffer, welcher am nächsten Morgen gegen frischen Puffer ausgewechselt und für weitere 2 h fortgesetzt wurde. Für den schonenden Austausch von Puffern wurden Dialyse-Cassetten der Fa. Pierce verwendet. Die Anwendung dieser Cassetten wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.21.3 Centricon 30, Amicon Ultra 30 und membra spin MINI

Um Protein-haltige-Fractionen nach Chromatographieläufen aufzukonzentrieren oder die Puffer-Zusammensetzung der Proteinlösung zu ändern, wurden Konzentratoren mit dem MWCO 30 der Fa. millipore, Bedford, USA, nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurden die Elutionsfraktionen (Volumen ca. 8-12 ml) mit den Konzentratoren Centricon 30 in 3-4 Zentrifugationsschritten (30 min, 5000x g, 4°C, JA20-Festwinkelrotor mit Gummi-Einsätzen) auf 500 µl aufkonzentriert. Mit den Konzentratoren Amicon Ultra 30, die ein größeres Volumen aufnehmen können (15 ml) wurde die Proteinlösung in einem Zentrifugationsschritt (20 min, 4500 rpm, 4°C) auf 500 µl aufkonzentriert. Danach wurde ein 2 x konzentrierter Aufbewahrungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 4 mM DTT) in gleichem Volumen hinzu gegeben. Um Proteine in diesem Volumen weiter aufkonzentrieren zu

können, wurden membra spin MINI (membraPure, Bodenheim) mit einer Trenngrenze von 30 kDa verwendet. Aufkonzentrierungen bis zu einem Volumen von ca. 25 µl sind so möglich.

2.22 Methoden zur Kristallisierung von Proteinen

Bei der Kristallisation scheidet sich ein Stoff (hier Protein) nach initialer Keimbildung aus einer übersättigten Lösung solange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist. Die Schwierigkeit besteht bei Proteinen allerdings darin, diesen Abscheidungsprozeß so zu kontrollieren, dass das Protein nicht mehr oder minder ungeordnet als Präzipitat ausfällt, sondern seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften entsprechend geordnete periodische Strukturen ausbildet, also kristallisiert.

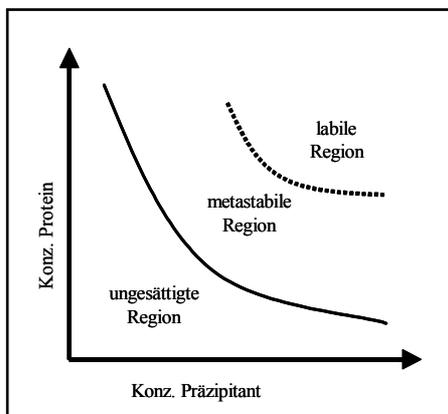


Abbildung 2.2

Vereinfachtes Phasendiagramm der Proteinlöslichkeit als Funktion der Präzipitantkonzentration: Aufgetragen ist die Proteinkonzentration einer Lösung gegen die Konzentration des Fällungsmittels. Unterhalb der durchgezogenen Linie bleibt die Lösung über die Zeit unverändert. In der metastabilen Region liegt das Protein als übersättigte Lösung vor, wohingegen es in der labilen Region fast unverzüglich als Präzipitat ausfällt. Keimbildung und damit Kristallisation findet in der metastabilen Region statt. Die Keimbildungsrate (Keime/Zeit/Volumen) erhöht sich, je mehr sich der Zustand der Lösung der labilen Region nähert.

Die Parameter, über die die Kristallisation von Proteinen beeinflusst werden kann, sind u.a. die Konzentration des Proteins, der umgebende Puffer und der pH-Wert. Entscheidend für die Größe und Anzahl an Kristallen (verhält sich meist umgekehrt proportional) ist die Kristallisationskeimbildungsrate im Kristallisationsansatz sowie die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle. In der Praxis wird zumeist eine hoch- oder bereits überkonzentrierte metastabile Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Dies geschieht entweder in einem Schritt als Batch-Versuch oder mittels Methoden, die über eine langsame Equilibrierungsphase die Bedingungen für die Kristallisation schaffen (Dampfdiffusionsmethode).

2.22.1 Die Methode des „Sparse-Matrix-Screen“

Zuerst wurde zur Bestimmung initialer Kristallisationsbedingungen der in dieser Arbeit behandelten Proteine der „Sparse-Matrix-Screen“ (Jancarik und Kim, 1991; Cudney *et al.*, 1994) durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Fällungsmittel-Puffer verwendet, die in ihrer Zusammensetzung verschiedenste, bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen repräsentieren. Folgende „Screening Kits“ (Hampton Research) fanden Anwendung:

Crystal Screen I

1. 0.02 M CaCl₂ 0.1 M Na Acetate pH 4.6 30% MPD
2. 0.4 M Potassium Na Tartrate tetrahydrate
3. 0.4 M mono-NH₄ dihydrogen Phosphate
4. 0.1 M Tris/HClpH 8.5 2.0 M NH₄ Sulfate
5. 0.2 M tri-Na Citrate 0.1 M HEPES Na pH 7.5 30% v/v MPD
6. 0.2 M MgCl₂ 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 30% w/v PEG 4000
7. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 1.4 M Na Acetate trihydrate
8. 0.2 M Na Citrate 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 30% 2-Propanol
9. 0.2 M NH₄ Acetate 0.1 M Na Citrate pH 5.6 30% PEG 4000
10. 0.2 M NH₄ Acetate 0.1 M Na Acetate pH 4.6 30% PEG 4000
11. 0.1 M Na Citrate pH 5.6 1.0 M NH₄ Phosphate
12. 0.2 M MgCl₂ 0.1 M HEPES pH 7.5 30% 2-Propanol
13. 0.2 M tri-Na Citrate 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 30% PEG 400
14. 0.2 M CaCl₂ 0.1 M HEPES - Na pH 7.5 28% v/v PEG 400
15. 0.2 M NH₄ Sulf. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 30% PEG 8000
16. 0.1 M HEPES pH 7.5 1.5 M Lithium Sulfate
17. 0.2 M Lithium Sulfate 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 30% PEG 4000
18. 0.2 M Mg Acet. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 20% PEG 8000
19. 0.2 M NH₄ Acetate 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 30% 2-Propanol
20. 0.2 M NH₄ Sulfate 0.1 M Na Acetate pH 4.6 25% PEG 4000

21. 0.2 M Mg Acetate 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 30% MPD
22. 0.2 M Na Acetate 0.1 M Tris/HClpH 8.5 30% PEG 4000
23. 0.2 M MgCl₂ 0.1 M HEPES pH 7.530% v/v PEG 400
24. 0.2 M CaCl₂ 0.1 M Na Acetate pH 4.6 20% 2-Propanol
25. 0.1 M Imidazole pH 6.5 1.0 M Na Acetate
26. 0.2 M NH₄ Acetate 0.1 M tri-Na Citrate pH 5.6 30 % MPD
27. 0.2 M tri-Na Citrate 0.1 M HEPES pH 7.5 20% 2-Propanol
28. 0.2 M Na Acet. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 30% PEG 8000
29. 0.1 M HEPES pH 7.5 0.8 M K/Na Tartrate
30. 0.2 M NH₄ Sulfate 30% PEG 8000
31. 0.2 M NH₄ Sulfate 30% PEG 4000
32. 2.0 M NH₄ Sulfate
33. 4.0 M Na Formate
34. 0.1 M Na Acetate pH 4.6 2.0 M Na Formate
35. 0.1 M HEPES pH 7.5 0.8 M Na dihydrogen phosphate
36. 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 8% PEG 8000
37. 0.1 M Na Acetate pH 4.6 8% PEG 4000
38. 0.1 M HEPES pH 7.5 1.4 M tri-Na Citrate
39. 0.1 M HEPES pH 7.5 2% PEG400, 2.0 M NH₄ Sulfate
40. 0.1 M Na Citrate pH 5.6 20% 2-Propanol, 20% PEG 4000
41. 0.1 M HEPES pH 7.5 10% 2-Propanol, 20% PEG 4000
42. 0.05 M K-dihydrogen Phosphate 20% PEG 8000
43. 30% PEG 1500
44. 0.2 M Magnesium Formate
45. 0.2 M Zn Acet. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 18% PEG 8000
46. 0.2 M Ca Acet. 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5 18% PEG 8000
47. 0.1 M Na Acetate pH 4.6 2.0 M NH₄ Sulfate
48. 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 2.0 M NH₄ dihydrogen Phosphate
49. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate 2% w/v PEG 8000
50. 0.5 M Lithium Sulfate monohydrate 15% w/v PEG 8000

Crystal Screen II

1. 2.0 M Na chloride 10% PEG 6000
2. 0.01 M CTAB 0.5 M Na Chloride, 0.01 M Mg Chloride
3. 25% Ethylene Glycol
4. 35% Dioxane
5. 2.0 M NH₄ Sulfate 5% 2-Propanol
6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. 10% PEG1000
8. 1.5 M Na Chloride 10% Ethanol
9. 0.1 M Na Acetate pH 4.6 2.0 M Na Chloride
10. 0.2 M Na Chloride 0.1 M Na Acetate pH 4.6 30% MPD
11. 0.01 M Co Cl₂ 1 M Na Acetate pH 4.6 1.0 M 1,6 Hexanediol
12. 0.1 M CdCl₂ 0.1 M Na Acetate pH 4.630% PEG 400
13. 0.2 M NH₄ Sulf 0.1 M Na Acet. pH 4.6 30% PEG MME 2000
14. 0.2 M K/Na Tar 0.1 M tri-Na Citrate pH 5.6 2.0 M NH₄ Sulf.
15. 0.5 M NH₄ Sulfate 0.1 M tri-Na Citrate pH 5.61.0 M Li Sulf.
16. 0.5 M NaCl₂ 0.1 M Na Citrate pH 5.62% Ethyleneiminepoly.
17. 0.1 M tri-Na Citrate pH 5.635% tert-Butanol
18. 0.01 M FeCl₂ 0.1 M Na Citr pH 5.6 10% Jeffamine M-600®
19. 0.1 M tri-Na Citrate pH 5.6 2.5 M 1,6 Hexanediol
20. 0.1 M MES pH 6.5 1.6 M Magnesium Sulfate
21. 0.1 M Na phosphate 0.1 M MES pH 6.52.0 M Na Chloride
22. 0.1 M MES pH 6.5 12% PEG 20,000
23. 1.6 M NH₄ Sulfate 0.1 M MES pH 6.5 10% Dioxane
24. 0.05 M CsCl₂ 0.1 M MES pH 6.5 30% Jeffamine M-600®
25. 0.01 M CoCl₂ 0.1 M MES pH 6.51.8 M NH₄ Sulfate
26. 0.2 M NH₄ Sulfate 0.1 M MES pH 6.530% PEG MME 5000
27. 0.01 M Zinc Sulfate 0.1 M MES pH 6.5 25% PEG MME 550
28. None 1.6 M tri-Na Citrate pH 6.5
29. 0.5 M NH₄ Sulfate 0.1 M HEPES pH 7.5 30% MPD
30. 0.1 M HEPES pH 7.5 10% PEG6000, 5% MPD
31. 0.1 M HEPES pH 7.5 20% Jeffamine M-600®
32. 0.1 M Na Chloride 0.1 M HEPES pH 7.51.6 M NH₄ Sulfate
33. 0.1 M HEPES pH 7.52.0 M NH₄ Formate
34. 0.05 M Cd-Sulfate 0.1 M HEPES pH 7.51.0 M Na Acetate
35. 0.1 M HEPES pH 7.5 70% MPD
36. 0.1 M HEPES pH 7.5 4.3 M Na Chloride
37. 0.1 M HEPES pH 7.5 10% PEG 8000, 8% Ethylene Glycol
38. 0.1 M HEPES pH 7.520% PEG 10,000
39. 0.2 M MgCl₂ 0.1 M TRIS pH 8.53.4 M 1,6 Hexanediol
40. 0.1 M TRIS pH 8.525% tert-Butanol
41. 0.01 M Ni(II) Cl₂ 0.1 M TRIS pH 8.5 1.0 M Li Sulfate
42. 1.5 M NH₄ Sulf. 0.1 M TRIS pH 8.5 12% Glycerol anhydrous
43. 0.2 M NH₄ dihyd Phosphate 0.1 M TRIS pH 8.5 50% MPD
44. 0.1 M TRIS pH 8.5 20% Ethanol
45. 0.01 M Ni(II) Cl₂ 0.1 M TRIS pH 8.5 20% PEG MME 2000
46. 0.1 M Na Chloride 0.1 M Bicine pH 9.0 20% PEG MME 550
47. 0.1 M Bicine pH 9.02.0 M Magnesium Chloride
48. 2% Dioxane 0.1 M Bicine pH 9.0 10% PEG 20,000

Index Screen

1. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M Citric Acid pH 3.5
2. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M Na Acetate pH 4.5
3. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M Bis-Tris pH 5.5
4. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M Bis-Tris pH 6.5
5. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M HEPES pH 7.5
6. 2.0 M NH₄ Sulfate 0.1 M Tris pH 8.5
7. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M Citric Acid pH 3.5
8. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M Na Acetate pH 4.5
9. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M Bis-Tris pH 5.5
10. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M Bis-Tris pH 6.5
11. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M HEPES pH 7.5
12. 3.0 M NaCl₂ 0.1 M Tris pH 8.5
13. 0.3 M Mg Formate 0.1 M Bis-Tris pH 5.5
14. 0.5 M Mg Formate 0.1 M Bis-Tris pH 6.5
15. 0.5 M Mg Formate 0.1 M HEPES pH 7.5
16. 0.3 M Mg Formate 0.1 M Tris pH 8.5
17. 0.9 M Na dihydrogen Phosphate
18. 0.35 M Na dihydrogen Phosphate
19. 0.04 M Na dihydrogen Phosphate
20. 1.4 M tri-Na Citrate dihydrate 0.1 M HEPES pH 7.5
21. 1.8 M tri-NH₄ Citrate pH 7.0
22. 0.8 M Succinic Acid pH 7.0
23. 2.1 M DL-Malic Acid pH 7.0
24. 2.8 M Na Acetate pH 7.0
25. 3.5 M Na Formate pH 7.0
26. 1.1 M NH₄ Tartrate pH 7.0
27. 2.4 M Na Malonate pH 7.0
28. 35% Tacsimate pH 7.0
29. 60% Tacsimate pH 7.0
30. 0.1 M NaCl₂ 1.5 M NH₄ Sulfate 0.1 M Bis-Tris pH 6.5
31. 0.8 M K Na Tartrate 0.5% PEGMME 50000.1 M Tris pH 8.5
32. 1.0 M NH₄ Sulfate 1% PEG 33500.1 M Bis-Tris pH 5.5
33. 1.1 M Mal pH 7.5% Jeff ED-2001 pH 7.0 1 M HEPES pH 7.0
34. 1.0 M SA pH 7.0 1% PEGMME 20000.1 M HEPES pH 7.0
35. 1.0 M NH₄ Sulfate 0.5% PEG 80000.1 M HEPES pH 7.0
36. 15% TS pH 7.0 2% PEG 33500.1 M HEPES pH 7.0
37. 25% PEG1500
38. 30% Jeff M-600® Reagent pH 7.00.1 M HEPES pH 7.0
39. 30% Jeff ED-2001® Reagent pH 7.00.1 M HEPES pH 7.0
40. 25% PEG 33500.1 M Citric Acid pH 3.5
41. 25% PEG 33500.1 M Na Acetate trihydrate pH 4.5
42. 25% PEG 33500.1 M Bis-Tris pH 5.5
43. 25% PEG 33500.1 M Bis-Tris pH 6.5
44. 25% PEG 33500.1 M HEPES pH 7.5
45. 25% PEG 33500.1 M Tris pH 8.5
46. 20% PEGMME 50000.1 M Bis-Tris pH 6.5
47. 28% PEGMME 20000.1 M Bis-Tris pH 6.5
48. 0.2 M CaCl₂ 45% 2-M-2,4-PD0.1 M Bis-Tris pH 5.5
49. 0.2 M CaCl₂ 45% 2-M-2,4-PD0.1 M Bis-Tris pH 6.5
50. 0.2 M NH₄ Acetate 45% 2-M-2,4-PD 0.1 M Bis-Tris pH 5.5
51. 0.2 M NH₄ Acetate 45% 2-M-2,4-PD 0.1 M Bis-Tris pH 6.5
52. 0.2 M NH₄ Acetate 45% 2-M-2,4-PD 0.1 M HEPES pH 7.5
53. 0.2 M NH₄ Acetate 45% 2-M-2,4-PD 0.1 M Tris pH 8.5
54. 0.05 M CaCl₂ 30% PEGMME 55000.1 M Bis-Tris pH 6.5
55. 0.05 M MgCl₂ 30% PEGMME 55000.1 M HEPES pH 7.5
56. 0.2 M KCl₂ 35% PEP. 0.05 M HEPES pH 7.5
57. 0.05 M NH₄ Sulf. 30% PEE 0.05 M Bis-Tris pH 6.5
58. 45% Polypropylene Glycol P 4000.1 M Bis-Tris pH 6.5
59. 0.02 M MgCl₂ 22% PA Acid 5100 0.1 M HEPES pH 7.5
60. 0.01 M CoCl₂ 20% PVP K15. 0.1 M Tris pH 8.5
61. 0.2 M Proline 10% PEG 33500.1 M HEPES pH 7.5
62. 0.2 M TMA N-oxide 20% PEGMME 20000.1 M Tris pH 8.5
63. 5% TS pH 7.0 10% PEGMME 50000.1 M HEPES pH 7.0
64. 0.005 M CoCl₂ 0.1 M HEPES pH 7.512% PEG 3350
65. 0.1 M Bis-Tris pH 5.50.1 M NH₄ Acetate 17% PEG 10,000
66. 0.1 M Bis-Tris pH 5.50.2 M NH₄ Sulfate 25% PEG 3350
67. 0.1 M Bis-Tris pH 6.50.2 M NH₄ Sulfate 25% PEG 3350
68. 0.1 M HEPES pH 7.50.2 M NH₄ Sulfate 25% PEG 3350
69. 0.1 M Tris pH 8.50.2 M NH₄ Sulfate 25% PEG 3350
70. 0.1 M Bis-Tris pH 5.50.2 M NaCl₂ 25% PEG 3350
71. 0.1 M Bis-Tris pH 6.50.2 M NaCl₂ 25% PEG 3350
72. 0.1 M HEPES pH 7.50.2 M NaCl₂ 25% PEG 3350
73. 0.1 M Tris pH 8.50.2 M NaCl₂ 25% PEG 3350
74. 0.1 M Bis-Tris pH 5.5 0.2 M Lithium Sulfate 25% PEG 3350
75. 0.1 M Bis-Tris pH 6.5 0.2 M Lithium Sulfate 25% PEG 3350
76. 0.1 M HEPES pH 7.5 0.2 M Lithium Sulfate 25% PEG 3350
77. 0.1 M Tris pH 8.50.2 M Lithium Sulfate 25% PEG 3350
78. 0.1 M Bis-Tris pH 5.50.2 M NH₄ Acetate 25% PEG 3350
79. 0.1 M Bis-Tris pH 6.50.2 M NH₄ Acetate 25% PEG 3350
80. 0.1 M HEPES pH 7.50.2 M NH₄ Acetate 25% PEG 3350
81. 0.1 M Tris pH 8.50.2 M NH₄ Acetate 25% PEG 3350
82. 0.1 M Bis-Tris pH 5.50.2 M MgCl₂ 25% PEG 3350
83. 0.1 M Bis-Tris pH 6.50.2 M MgCl₂ 25% PEG 3350
84. 0.1 M HEPES pH 7.50.2 M MgCl₂ 25% PEG 3350
85. 0.1 M Tris/HCl pH 8.5
85. 0.2 M MgCl₂
85. 25% PEG 3350
86. 0.2 M K Na Tartrate tetrahydrate 20% PEG 3350
87. 0.2 M Na Malonate pH 7.0 20% PEG 3350
88. 0.2 M tri-NH₄ Citrate pH 7.0 20% PEG 3350
89. 0.1 M Succinic Acid pH 7.0 15% PEG 3350
90. 0.2 M Na Formate 20% PEG 3350
91. 0.15 M DL-Malic Acid pH 7.0 20% PEG 3350
92. 0.1 M Mg Formate 15% PEG 3350
93. 0.05 M Zinc Acetate 20% PEG 3350
94. 0.2 M tri-Na Citrate 20% PEG 3350
95. 0.1 M K Thiocyanate 30% PEGMME 2000
96. 0.15 M K Bromide 30% PEGMME 2000

Alle Kristallisationsansätze wurden in 24-well-Titerplatten (Fa. Falcon) durchgeführt. Die Ansätze wurden mit mittelviskosem Silikonfett (Fa. Bayer) und Deckgläschen (18

mm, Fa. Hampton), die silikonisiert waren abgedichtet. Kristallisationsexperimente wurden bei 18°C und 4°C gelagert.

2.22.2 Dampfdiffusionsmethode

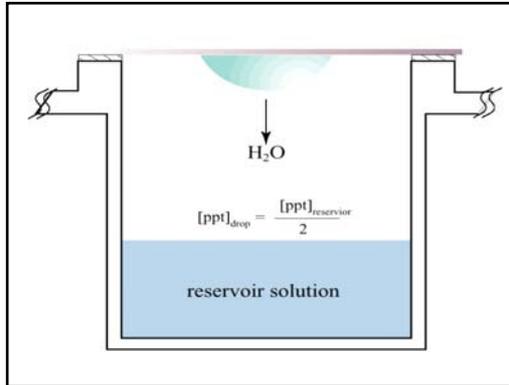


Abbildung 2.3

Dampfdiffusionsmethode:

(aus Katalog Fa. Hampton Research)

Bei dieser Methode wird eine Proteinlösung mit dem Fällungsmittel vermengt, welches dadurch verdünnt wird. Dieser Ansatz mit einem kleinen Volumen (2 bis 20 µl) steht in einem abgeschlossenen System über dem Dampfdruck mit einem großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels in Verbindung (meist 1 ml). Die hygroskopische Equilibrierung des Systems, d.h. der Zustand, in dem kein weiterer Netto-Austausch über die Gasphase stattfindet, vollzieht sich in der Regel binnen 24 bis 48 h. Diese Zeit kann durch eine Isolationsschicht über dem Reservoir, z.B. Silikonöl, verlängert

werden. In unseren Ansätzen bildeten sich die meisten Kristalle erst nach 4-6 Wochen. Nach Equilibrierung sollte das Protein überkonzentriert vorliegen, damit sich in Abhängigkeit von der Keimbildungsrate Kristalle ausbilden können.

2.22.3 Färbung und proteinbiochemische Analysen von Kristallen

Um zu verifizieren, dass in den Ansätzen Protein kristallisiert ist und nicht Salz aus dem Puffer, wurden Kristalle mit verschiedenen Farbstoffen behandelt, die spezifisch an Protein binden. Hierzu wurde i.A. 0,5 µl des Farbstoffes zu dem Ansatz gegeben. Als Farbstoffe dienen Coomassie (blau) (Iz It, Fa. Hampton Research), Mercurichrom (rot) und Sulphorhodamin B (rosa).

Um die Identität der kristallisierten Proteine zu kontrollieren, wurden Kristalle zunächst dem Ansatz entnommen und mehrfach in Reservoirlösung gewaschen. Dies geschah entweder durch manuelles Umsetzen einzelner Kristalle oder durch Zentrifugation (mit gefärbten Kristallen). Die Kristalle wurden in 8 M Harnstoff aufgelöst und mittels SDS-Page und ggf. Westernblots analysiert.

2.23 Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP)

Mittels Chromatin-Immuno-Präzipitation wurden DNA-bindende und daran assoziierte Proteine durch Crosslinking an die Chromatinstruktur immobilisiert. Diese Methode fand Anwendung, um die Kern-Lokalisierung bestimmter Proteine unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen. Dabei wurden Zellen bis zu einer OD₆₀₀ 0,4 in 500 ml YEP, 2% Glycerol, 3% Milchsäure und 0,05% Glukose angezogen. 250 ml der Kultur wurden 20 min mit Galaktose bis zu einer Endkonzentration von 2% induziert. Die restlichen 250 ml repräsentierten einen nicht induzierten Zustand. Um die DNA-bindenden Proteine an die Chromatinstruktur zu vernetzen wurde dann Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1% für 30 min hinzugegeben. Mit Glycin bis zu einer Endkonzentration von 300 mM wurde die Reaktion dann wieder abgestoppt. Alle darauffolgenden Schritte wurden weiter bei 4 °C durchgeführt. Nach zwei Waschschritten mit TBS-Puffer (20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH 8,0) konnte das Zellpellet bei -20°C aufbewahrt werden.

Zum Aufschluß der Zellen wurde das Zellpellet in 500 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0 ; 10 mM EDTA; 1% SDS; 1 mM PMSF) gelöst und mit Glasperlen

auf dem Vibrax (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) für 20 min aufgeschlossen. Die Überstände über den Glasperlen wurden gesammelt. In einem weiteren Schritt wurden die Glasperlen nochmals mit 500 µl Lysis-Puffer gewaschen und dieser mit dem ersten Überstand vereinigt. Das Lysat wurde in der Ultrazentrifuge bei 200000x g im TLA 100.2 Rotor für 12 min zentrifugiert, um das vernetzte, unlösliche Chromatin zu pelletieren. Das Pellet wurde dann mit 1ml Lysis-Puffer gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um das Pellet komplett zu lösen, die DNA zu scheren und das Chromatin zu solubilisieren wurde der Ansatz 3-4 x 12 sek sonifiziert bis zu einer durchschnittlichen DNA-Fragment-Größe von etwa 500-1000 bp. Das so gelöste Chromatin wurde von dem nicht solubilisierten Material durch weitere Zentrifugation im TLA 100.2 Rotor bei 13000x g für 15min getrennt. Das Volumen des solubilisierten Chromatins wurde dann mit Dillutions-Puffer I (16,7 mM Tris/HCl, pH 8,0; 16,7 mM NaCl; 1,2 mM EDTA; 0,01% SDS; 1,1 mM Triton-X 100; 1mM PMSF) auf 5 ml aufgefüllt und in 1 ml Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

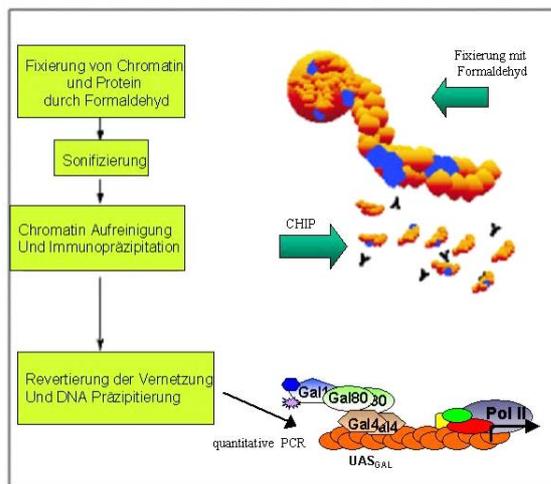


Abbildung 2.4

Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP). Mittels dieser Methode isoliert man nach Crosslinking mit Formaldehyd DNA-Fragmente über an Chromatin gebundene Proteine.

Für die Immunpräzipitation der an die DNA gebundenen Proteine wurden je 5 µl Antikörper-Serum (hier Gall [Anti-Rabbit, Jutta Meyer 1993] oder Gal80 [Anti-Rabbit, Frank Zenke]) zu je 1 ml Chromatin hinzugeben und über Nacht inkubiert. Die Chromatin-Lösung wurde dann für 3 h mit 100 µl 75%iger ProteinA-Sepharose (Amersham Biosciences #17-0780-01) inkubiert. Zuvor mußte jedoch die ProteinA-Sepharose aufgearbeitet werden. 500 µl der ProteinA-Sepharose wurden mit 2,5 ml H₂O zum Quellen gebracht und mit insgesamt 200 ml dest. H₂O gewaschen. Mit Dillutions-Puffer I wurde die Sepharose auf eine Konzentration von 75% eingestellt und konnte so konzentriert wie oben beschrieben eingesetzt werden. Nach der Inkubation mit der ProteinA-Sepharose folgten vier verschiedene Waschschrte in einem Volumen von 1 ml des jeweils verwendeten Puffers (5 min schütteln bei 4°C und anschließende kurze Zentrifugation bei 13000 rpm). Zunächst wurde der Ansatz mit Dillutions-Puffer I gewaschen und dann mit Dillutions-Puffer II (16,7 mM Tris/HCl, pH 8,0; 16,7 mM NaCl; 1,2 mM EDTA; 0,01% SDS; 1,1 mM Triton-X 100; 1mM PMSF, 500 mM NaCl). Im Folgenden wurde weiter mit Wasch-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,25 mM LiCl; 0,5% NP-40; 0,5% Na-Deoxycholate; 1 mM EDTA) und abschließend mit TE-Puffer gewaschen.

Um die Antikörper mit dem daran gebundenen Protein/DNA-Komplex von der ProteinA-Sepharose zu eluieren, wurde in einer ersten Elution der Ansatz mit 100 µl Elutions-Puffer I (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% SDS) versetzt, für 15 min bei 65°C inkubiert und der Überstand über der ProteinA-Sepharose gesammelt. Durch einen zweiten Elutionsschritt mit 150 µl Elutions-Puffer II (TE; 0,67% SDS) wurde der noch an der Sepharose gebundene Rest-Antikörper/Protein/DNA-Komplex eluiert und mit der ersten Elutionsfraktion vereinigt. Zur Revertierung der Vernetzung wurde das Eluat dann bei 65°C über Nacht inkubiert und am darauf folgenden Tag mit Proteinase-K für weitere 3 h bei 37 °C verdaut. Ansatz: 250 µl Eluat, 250 µl TE-Puffer, 5 µl Glycogen [1 mg/ml] und 5 µl Proteinase-K [20 mg/ml]. Die Präzipitation der DNA als Indikator für eine Kernlokalisierung erfolgte mit Phenol/Chloroform. Zu diesem

Zweck wurde der Ansatz mit 55 μl 4 M LiCl versetzt und mit 1x Phenol und dann 1 x Phenol/Chloroform präzipitert. Die DNA wurde dann mit dem Salz in der wässrigen Phase mit 1 ml 96%igem Ethanol für 15 min bei RT präzipitert und anschließend für 15 min bei 13000 rpm pelletiert. Um das Salz aus der Lösung zu entfernen, wurde sie mit 1 ml 70%igem Ethanol versetzt und erneut für 10 min bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde dann getrocknet und für die folgenden Analysen in 50 μl TE aufgenommen. Um mögliche störende RNasen zu entfernen, wurde der Ansatz mit 10 μg RNaseA für eine Stunde bei 37°C verdaut. Die präzipitierte DNA wurde dann per PCR weiter analysiert. Dabei wurde die UAS_{GAL} -Region (Bindestelle für aktivierende und reprimierende Proteine der GAL -Gene) mit dem Primerpaar UAShin/UASher amplifiziert und zur Kontrolle der Spezifität der Präzipitation zum einen mit dem Primerpaar 4kbuphin/4kbupher, welches die Region 4 kb oberhalb der UAS_{GAL} -Region repräsentiert und zum anderen mit dem Primerpaar Fus1hin/Fus1her, welches einen Bereich des FUS1 -Gens auf einem anderen Chromosom amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann in einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt, mit Ethidium-Bromid angefärbt und anschließend mit Scion Image Beta 4.0.2 quantifiziert.

2.24 Protein-Crosslinking

2.24.1 *In vivo*-Crosslinking mittels Formaldehyd

Crosslinking mittels Formaldehyd ist u.a. eine allgemeine Methode, um Proteine, die in räumliche Nähe gelangen, zu vernetzen. Bei dieser Vernetzung werden sogenannte Methylen-Brücken ausgebildet, die durch die Aldehyd-Gruppe vermittelt wird. Durch Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% ins Medium und einer Inkubation von 20 min bei RT, können Proteine sehr effektiv vernetzt werden. Die Reaktion wird mit Glycin (Endkonzentration 300 mM) abgestoppt.

2.24.2 Crosslinking nach Brown & Kodadek

Diese Crosslinking-Methode kann zur Vernetzung von spezifischen Protein-Wechselwirkungen verwendet werden. Sie basiert auf der Reaktion zwischen einem Tripeptid (GlyGlyHis), alternativ einem 6xHis-Tag und Nickel-(II)-Acetat-Komplex mit dem reaktiven Reagenz Mg-Monoperoxyphthalsäure (MMPP). Bei der von Brown und Kodadek (1995) entwickelten Methode werden Nickel-(II)-Acetat und das Tripeptid in equimolaren Verhältnissen zusammen gegeben. Diese beiden Komponenten bilden einen Komplex, der nach Zugabe von MMPP, mit Proteinen in Lösung interagiert. Durch Weitergabe eines Elektrons von diesem Komplex an das Protein kann dieses mit einem möglichen gebundenen Interaktionspartner vernetzt werden. Aufgrund dessen wird diese Art von Crosslinker auch als 0 Å-Crosslinker bezeichnet, da eine direkte Interaktion Voraussetzung ist (Abbildung 2.5).

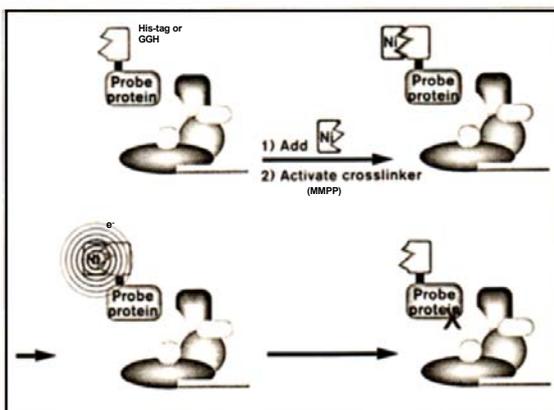


Abbildung 2.5
Crosslinking nach Brown
Kodadek (1995). Schematische
Darstellung des Protein-
Crosslinkings mit einem 6xHis-
Tag (alternativ mit einem
Tripeptid GlyGlyHis),
Monoperoxyphthalsäure und
Nickel-Acetat.

Um Gal1 und Gal80 miteinander zu vernetzen, wurden beide Proteine nach der in Abschnitt 2.20.4 beschriebenen Methode angereichert. LexAGal1 wurde über Latexbeads immobilisiert und mit einem Rohextrakt der VP16Gal80 in Überexpression, versetzt. In einem weiteren Schritt wurde dies umgekehrt gehandhabt. Den Ansätzen wurde ein Komplex aus 10 mM Nickel-(II)-Acetat und 10 mM GlyGlyHis nach 10 min Inkubation hinzugegeben und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Crosslink-Reaktion wurde dann mit 20 mM MMPP gestartet und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von SDS-Blaumarker wurde die Reaktion gestoppt und die Proteine von den Beads eluiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend mit Antikörpern gegen VP16 und LexA mittels Western-Blot analysiert.

2.25 Protease-Schutz-Experiment

Nach Wechselwirkung zweier Proteine sind Bereiche der Interaktionsflächen dieser Moleküle für Enzyme nicht mehr erreichbar. Bei Verdau mit Proteasen bleiben solche Bereiche unangetastet und können nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel und Färbung mit Coomassie identifiziert werden. Mit Hilfe dieses Protease-Schutz-Experiments sollen die Interaktionsdomänen zwischen den Proteinen HisGal1 und HisGal80 aufgezeigt werden. Die Proteine HisGal1 und HisGal80 wurden, wie in den Abschnitten 2.20.1 und 2.20.2 beschrieben, aufgereinigt. 5 µg/µl HisGal1 und 10 µg/µl HisGal80 wurden in einem Volumen von 40 µl miteinander gemischt. In Anwesenheit von 2,5 mM ATP und 2,5 mM Galaktose und Inkubation bei 30°C für 1 h bildeten beide Proteine einen Komplex. Dieser Komplex wurde dann mit 0,03 U α-Chymotrypsin versetzt und für 30 min bei 30°C verdaut. Die Ansätze wurden anschließend in einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

3. Ergebnisse

3.1 Two-Hybrid-Analyse von *lexAGal1* und *VP16Gal80* aus *K. lactis* in der heterologen Hefe *S. cerevisiae*

Vorangegangene Mutationsanalysen haben gezeigt, dass Gal1 ein bifunktionelles Protein ist. Zum einen setzt es als erstes Enzym des Leloir-Stoffwechselweges Galaktose zu Galaktose-1-P um und zum anderen vermittelt es als regulatorisches Protein die Dereprimierung der *GAL*-Gene (Meyer *et al.*, 1991; Vollenbroich *et al.*, 1999). So resultieren Einzel-Aminosäureaustausche in vier möglichen Phänotypen. **Typ I:** regulatorisch defekt, aber noch Kinase-positiv; **Typ II:** regulatorisch aktiv, aber Kinase-defekt; **Typ III:** defekt in beiden Funktionen und **Typ IV:** konstitutiv aktiv, unabhängig von der Kohlenstoffquelle. Um zusätzliche Informationen bezüglich der Interaktion mit dem transkriptionellen Repressor Gal80 zu bekommen, wurden weitere Gal1-Mutanten durch „random-PCR-Mutagenese“ generiert und mit schon in der Arbeitsgruppe erzeugten Mutanten in einer Two-Hybrid-Analyse verglichen.

Das Two-Hybrid-System ist eine molekulargenetische Methode, um Protein-Protein-Interaktionen mittels eines Reportergens nachweisen zu können (Fields und Song, 1989; Phizicky und Fields, 1995). Man nutzt hier die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren einen modularen Aufbau haben. Wie schon in der Einleitung erwähnt, haben viele Transkriptionsfaktoren eine sequenzspezifische DNA-Bindedomäne, die an den Promotor bestimmter Gene bindet. Zudem haben sie, insofern es sich um Aktivator-Proteine handelt, eine Aktivierungsdomäne, die mit dem Pol-II-Komplex in Wechselwirkung tritt (Abbildung 1.3). Diese beiden Strukturmerkmale müssen nicht kovalent miteinander verknüpft sein, sondern können durch Interaktion zweier beliebiger Proteine in räumliche Nähe gebracht werden (Phizicky und Fields, 1995). Man fusioniert einen der Interaktionspartner an eine DNA-Bindedomäne und den anderen an eine Aktivierungsdomäne. Durch Expression dieser Fusionsproteine in einem Stamm mit einem artifiziellen Promotor-Konstrukt, das eine inserierte LexA-Bindestelle besitzt, kann die Wechselwirkung dieser beiden Proteine zur Transkriptionsaktivierung eines gut meßbaren Reportergens (z.B. *lacZ*) führen. Die Menge des gebildeteten Reportergen-Produkts kann als direktes Maß für die Stärke der Interaktion verwendet werden.

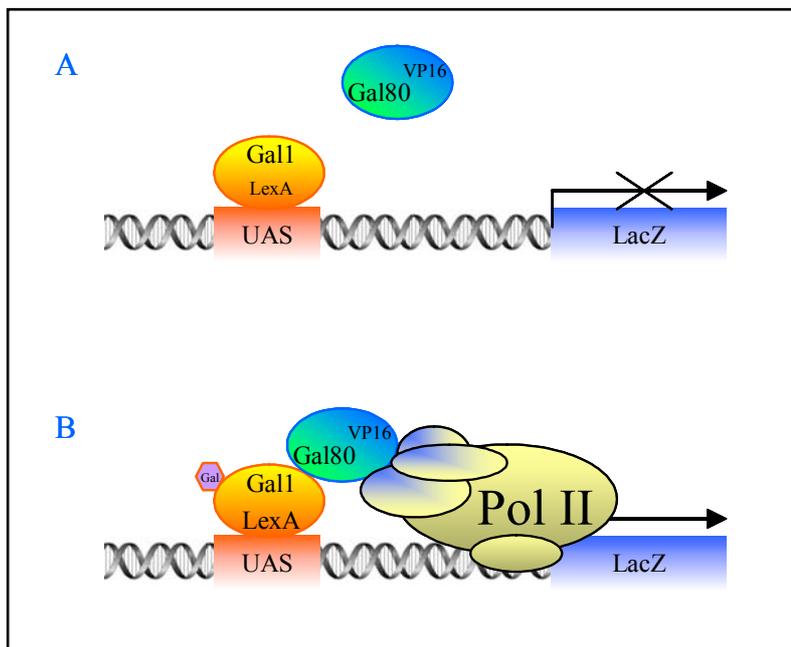


Abbildung 3.1

Schematische Darstellung des verwendeten Two-Hybrid-Systems. Das *GAL1*-Gen wurde mit der DNA-Bindedomäne des Repressors *lexA* aus *E. coli* und das *GAL80*-Gen mit der transkriptionsaktivierenden-Domäne des VP16-Proteins aus *Herpes simplex* fusioniert. Abbildung 9A zeigt die Situation in der Zelle in Abwesenheit von Galaktose im Medium. Abbildung 9B veranschaulicht die substratinduzierte Wechselwirkung beider Fusionsproteine bei Anwesenheit von Galaktose im Medium.

Das in dieser Arbeit verwendete Two-Hybrid-System (Abbildung 3.1) basiert auf den Fusionsproteinen lexAGal1 und VP16Gal80. Das Fusionsprotein der Galaktokinase Gal1 besitzt N-terminal die DNA-Bindedomäne des bakteriellen Repressors lexA (Vojtek *et al.*, 1993), der Inhibitor Gal80 eine N-terminale Fusion mit der Aktivierungsdomäne des VP16 aus *Herpes simplex* (Triezenberg *et al.*, 1988; Vollenbroich *et al.*, 1999).

Nach Co-Transformation des Two-Hybrid-Stammes CTY10-5d mit den beiden Wildtyp-Konstrukten konnte in Anwesenheit von Glukose/Galaktose im Medium eine *lacZ*-Expression mit einer Aktivität von 1400 munits/mg gemessen werden (Tabelle 3.1). Unter Glukose-Bedingungen war keine Aktivität meßbar. Die Anwesenheit von Galaktose vermittelt also die Interaktion der beiden Fusionsproteine. Um einen Einfluß von Galaktose auf das Expressionsniveau auszuschließen, wird die Gal1-Fusion nicht durch den eigenen Promotor, sondern durch den *ADHI*-Promotor kontrolliert und die Gal80-Fusion durch den *PGK*-Promotor. Beide Promotoren sind konstitutiv aktiv auf Glukose und unabhängig von Galaktose. Da beide Promotoren eine vergleichbare Expression bewirken, wird gewährleistet, dass unter allen im Two-Hybrid-System verwendeten Bedingungen die Konzentration beider Proteine vergleichbar ist und lediglich der Einfluß von Galaktose auf die Interaktion beider Proteine gemessen wird.

β-Galaktosidase-Aktivität (munits/mg)						
lexA-Fusion	Vektor		hohe Kopienzahl		integriert	
	pASV1		VP16GAL80		VP16GAL80	
	Glukose	Glukose /Galaktose	Glukose	Glukose /Galaktose	Glukose	Glukose /Galaktose
pBTM116 (Vektor)	0	0	0	0	0	0
<i>GAL1</i> Wildtyp	0	0	0	1400	0	510

Tabelle 3.1 Die Wechselwirkung zwischen lexAGal1 und VP16Gal80 im Two-Hybrid-System. Der Stamm CTY10-5d wurde zur Kontrolle mit den jeweiligen Ausgangsvektoren (ohne Fusion) pBTM116 und pASV1 sowie mit den Plasmiden, die für die Fusionsproteine codieren (plxGal1 und pVKG80), transformiert. Die Wechselwirkung zwischen lexAGal1 und Gal80 wurde zum einen in hoher Kopienzahl durchgeführt und zum anderen mit integriertem VP16Gal80 im Stamm CTYVKG80. Es wurde die β-Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von Galaktose gemessen und in munits/mg angegeben.

Um den Einfluß der Gal80-Konzentration zu beobachten, wurde *VP16GAL80* in den Stamm CTY10-5d integriert und erneut im Two-Hybrid-System gegen LexAGal1 gemessen (Tabelle 3.1). Unter diesen Bedingungen ist mit 510 munits/mg eine um den Faktor drei verminderte β-Galaktosidase-Aktivität zu beobachten, die aber nach wie vor Galaktose-abhängig ist. Diese Messung zeigt, dass die Konzentration von Gal80 jetzt offensichtlich unter dem Sättigungsbereich liegt, eine Bedingung, bei der Änderungen in der Affinität beider Proteine deutlich beobachtet werden können.

3.2 Erzeugung neuer *gal1*-Mutationen durch „Random-PCR-Mutagenese“

In vorangegangenen Arbeiten sind verschiedene Mutationen von *GAL1* aus *K. lactis* und Gal3 aus *S. cerevisiae* identifiziert worden. Diese Mutanten zeigten ein ganzes Spektrum von veränderten Wechselwirkungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Blank *et al.*, 1997; Platt und Reece, 1998; Vollenbroich *et al.*, 1999, Menezes pers. Mitteilung). Es ist aber bisher nicht gelungen, Mutationen zu finden, die eindeutige Rückschlüsse bezüglich der Interaktionsdomänen von Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* bzw. Gal3 und Gal80 aus *S. cerevisiae* zulassen. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, wurden

im Folgenden weitere *GALI*-Mutanten mit verschiedenen Punktmutationen erzeugt. Die bisherigen Mutationen von Gal1 wurden durch verschiedene mutagene Substanzen generiert (Vollenbroich *et al.*, 1999). Diese Methode hatte den Nachteil, dass man die Lokalisierung der Punktmutationen nur durch Sequenzierung des kompletten ORF's vornehmen konnte. Zur Vereinfachung wurde das *GALI*-Gen in drei Abschnitte unterteilt (Abbildung 3.2) und die Mutagenese per PCR mit geeigneten Oligonukleotiden durchgeführt (Abschnitt 2.4). Um zufällige Mutationen zu erzeugen, wurden die PCR-Bedingungen so verändert, dass ausschließlich einzelne Punktmutationen oder höchstens zwei Austausche pro Abschnitt entstehen (Lin-Goerke *et al.*, 1997). Unter nicht-mutagenisierenden Bedingungen wird ein Nukleotid-Mix mit equimolaren Mengen der einzelnen Basen verwendet. Zur Mutagenese wurde der Mix dahingehend verändert, dass in vier verschiedenen Ansätzen je eine Base im Überschuss im Verhältnis 1:10 vorhanden ist. Um zu verhindern, dass es zu Synthese-Abbrüchen kam, wurde den Ansätzen 10 mM dITP als Basen-Analogen zugesetzt, welches den Vorteil hat, dass es an beliebiger Stelle eingebaut werden kann. Das Analogon dITP kann mit allen Basen Wasserstoff-Brücken-Bindungen (H-Brücken) eingehen und verhindert so DNA-Einzelstrang-Abbrüche während der Synthese (Spee *et al.*, 1993). Ein weiterer Vorteil war der Einbau einer beliebigen Base an dieser Stelle im nächsten Synthese-Schritt der PCR. Viele Polymerasen, die für eine „normale“ PCR verwendet werden, haben eine sogenannte Proof-Reading-Funktion. Mittels einer 3'-5'-Exonuclease-Aktivität werden viele Fehler der Synthese wieder korrigiert. Um dem entgegen zu wirken, wurde die Taq-Polymerase verwendet, welche keine Proof-Reading-Funktion hat und somit zufällig entstandene Mutationen überliert. Die mutagenisierten Fragmente von *GALI* wurden über homologe Rekombination in den Ausgangsvektor plxAGal1 inseriert (Abbildung 3.2). Um den Vorgang der homologen Rekombination *in vivo* zu vereinfachen, wurde der Ausgangsvektor durch Restriktionsverdau im Bereich des *GALI*-Gens linearisiert. Die *in vivo* Rekombination erfolgte dann durch Transformation des Stammes CTY10-5d mit den linearisierten Ausgangsvektoren und den mutagenisierten *GALI*-Fragmenten. Für die Two-Hybrid-Analyse wurde der Stamm zudem mit dem Vektor pVKG80, der für die Gal80 Fusion mit der VP16-Aktivierungsdomäne kodiert, co-transformiert. Nach Selektion der transformierten Stämme auf Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Uracil wurden diese nach Wachstum unter Mangelbedingungen auf Glukose- und Glukose/Galaktose-Medium replikaplatziert. Durch einen X-Gal-Overlay-Assay (Suckow und Hollenberg, 1998) oder alternativ durch einen X-Gal-Filterassay wurden die gewachsenen Transformanten auf beiden Medien auf β -Galaktosidase-Aktivität untersucht.

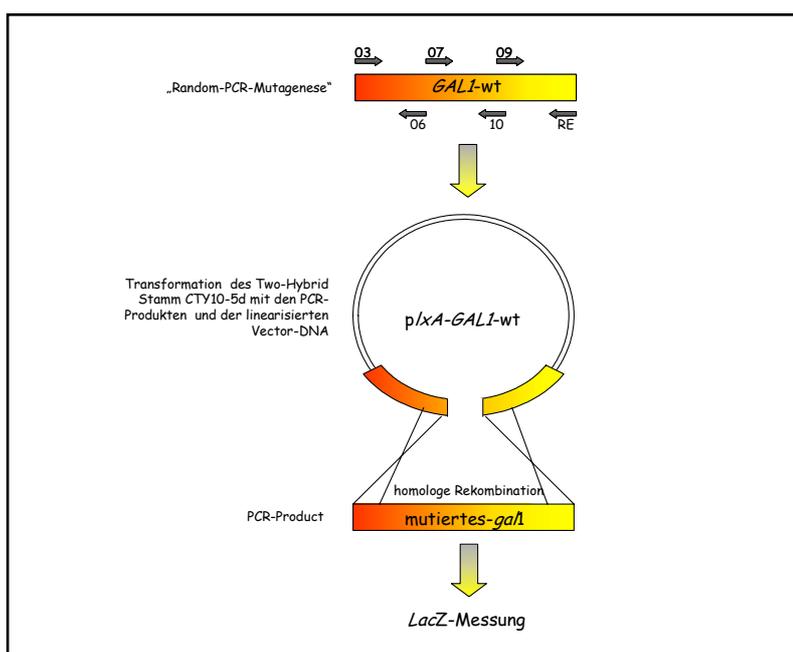


Abbildung 3.2

Schematische Darstellung der „random-PCR-Mutagenese“: Mittels der Primerpaare gal1-03/gal1-06; gal1-07/gal1-10 und gal1-09/gal1-RE wurde das *GALI*-Gen in drei Abschnitte unterteilt und wie in Abschnitt 2.10.3 mutagenisiert. Durch homologe Rekombination wurden die generierten *GALI*-Fragmente in den linearisierten Vektor plxAGal1 eingebracht. Nach Transformation des Two-Hybrid-Stammes CTY10-5d wurde eine β -Galaktosidase-Messung zur Quantifizierung der Komplexbildung durchgeführt.

Etwa 1100 unabhängige Transformanten wurden untersucht. 123 Transformanten zeigten hierbei einen veränderten Phänotyp. 42 Kolonien hatten einen konstitutiven Phänotyp, da sie sowohl auf Glukose als auch auf Glukose/Galaktose eine β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen. 81 Transformanten zeigten weder auf Glukose noch auf Glukose/Galaktose eine β -Galaktosidase-Aktivität. Mittels Plasmid-Rescue wurden die mutagenisierten *plxAGal1*-Plasmide aus der Hefe isoliert und in *E. coli* angereichert. Anschließende analytische Restriktionsverdauung der Plasmide sollten einen ersten Hinweis ergeben, ob die Plasmide ein komplettes *GALI*-ORF enthielten. Mit den Plasmiden, die ein vollständiges *GALI*-ORF aufwiesen, wurde der Stamm CTY10-5d erneut für eine Two-Hybrid-Analyse transformiert. Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität dieser Transformanten, kombiniert mit einem Gal1- und Gal80-spezifischen Western-Blot (Abbildung 3.3), erbrachte sechs mutagenisierte Allele. Fünf davon wiesen einen Regulationsdefekt auf (Bezeichnung: *gall-37*, *gall-40*, *gall-42*, *gallHY* und *gall-22*), und einer war konstitutiv (Bezeichnung: *gall-BB*).

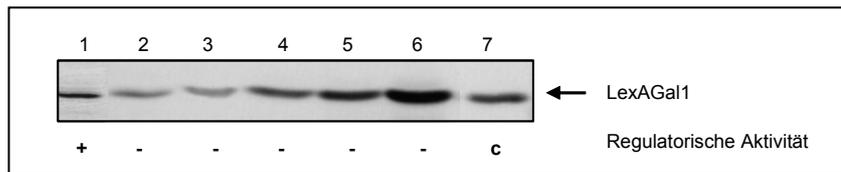


Abbildung 3.3

Western Analyse von Zell-Extrakten der isolierten *lexAgal1*-Mutanten im *S. cerevisiae*-Stamm CTY10-5d mit dem LexA-Antikörper. Spur 1 - LexA-Gal1-wt, 2 - LexA-gal1-37, 3 - LexA-gal1-40, 4 - LexA-gal1-42, 5 - LexA-gal1-HY, 6 - LexA-gal1-22, 7 - LexA-gal1-BB

Nach Sequenzierung der Plasmide konnten folgende Austausche identifiziert werden: *gall-22* Y474C, *gall-37* F368S, M409S; *gall-40* Y300H, N337S, *gall-42* H379R, V454L, *gall-HY* H379R, N337S und *gall-BB* E321G, L341P. Demnach hatten alle Mutanten einen einfachen oder zweifachen Aminosäure-Austausch in der C-terminalen Region. Interessanterweise liegen aber die meisten Austausche nah zusammen.

3.3 Phänotyp-Screen der neuen *gall*-Mutanten

3.3.1 Charakterisierung der neuen *gall*-Interaktionsmutanten im Two-Hybrid-System

Die neuen *gall*-Mutanten wurden bisher nur im X-Gal-Overlay-Assay und dem X-Gal-Filter-Test gemessen. Um sie zu quantifizieren, wurden die β -Galaktosidase-Aktivitäten im Proteinrohextrakt mit dem ONPG-Test bestimmt. Damit ein direkter Vergleich mit den schon vorhandenen Mutanten (Vollenbroich et al., 1999 und Menezes, pers. Mitteilung; Tabelle 3.2) möglich ist, wurden diese in allen Untersuchungen mitbestimmt.

mutierte Allele	Austausch	Referenz
<u>reg⁻ Mutanten</u>		
<i>gall-m1</i>	E254C	Vollenbroich et al., 1999
<i>gall-m2</i>	R94C	Vollenbroich et al., 1999
<i>gall-14</i>	W114R	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gall-18</i>	D108A	Menezes, pers. Mitteilung
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>		
<i>gall-209</i>	N261Y	Vollenbroich et al., 1999
<u>konstitutive Mutanten</u>		
<i>gall-1C</i>	L385F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gall-2C</i>	G286F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gall-4C</i>	S40F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gall-d</i>	E285K	Vollenbroich et al., 1999

Tabelle 3.2

Zusammenfassung der bereits generierten *gall1*-Mutanten von Vollenbroich et al., 1999 und R. Menezes, pers. Mitteilung. Diese Mutationen wurden für die Charakterisierung der neuen Mutanten in allen Untersuchungen mitbestimmt.

Die Messungen der Interaktionsstärke zwischen den *galI*-Mutanten und VP16Gal80 im Two-Hybrid-System wurden sowohl in hoher Kopienzahl als auch mit integriertem *VP16GAL80* gemacht (Tabelle 3.3). Die neuen *galI*-Mutanten bestätigten auch in der Flüssigmessung ihren Phänotyp aus den Plattentests. Die regulationsdefekten Mutanten *galI-22*; *galI-37*, *galI-40*, *galI-42* und *galI-HY* hatten unter allen getesteten Bedingungen keine messbare intrazelluläre β -Galaktosidase-Aktivität. Im Vergleich zu den bereits bekannten regulationsdefekten *galI*-Mutanten ist kein Unterschied erkennbar. Lediglich die Mutanten *galI-m1* und *galI-m2* aus dieser Gruppe zeigten im Two-Hybrid-System eine deutlich messbare β -Galaktosidase-Aktivität. Die konstitutive Mutante *galI-BB* zeigt auch in der Flüssigmessung einen konstitutiven Phänotyp. Im Vergleich zu den konstitutiven Mutanten *galI-1C*, *galI-2C*, *galI-4C* und *galI-d* ist bei hoher Gal80-Kopienzahl eine deutlich höhere β -Galaktosidase-Aktivität auf Glukose messbar. Wie auch bei den anderen Mutanten ist der konstitutive Phänotyp bei niedriger Gal80-Kopienzahl nicht reproduzierbar. Dem stärkeren konstitutiven Phänotyp der Mutante *galI-BB* auf Glukose steht aber interessanterweise eine um den Faktor 2-3 verringerte β -Galaktosidase-Aktivität auf Glukose/Galaktose gegenüber. Die Affinität für VP16Gal80 im Two-Hybrid-System ist deutlich reduziert. Dieses Phänomen ist sowohl in hoher Kopienzahl als auch im integrierten Zustand ersichtlich.

lexA-Fusion	β -Galaktosidase-Aktivität (munits/mg)			
	integriert <i>VP16GAL80</i>		hohe Kopienzahl <i>VP16GAL80</i>	
	Glukose	Glukose/Galaktose	Glukose	Glukose/Galaktose
pBTM116 (Vektor)	0	0	0	0
<i>GAL1</i> Wildtyp	0	510	0	1400
<u>reg⁻ Mutanten</u>				
* <i>galI-22</i>	0	0	0	0
* <i>galI-40</i>	0	0	0	0
* <i>galI-HY</i>	0	0	0	0
* <i>galI-37</i>	0	0	0	0
* <i>galI-42</i>	0	0	0	0
<i>galI-m1</i>	0	0	3	960
<i>galI-m2</i>	0	100	2	1140
<i>galI-14</i>	0	0	0	0
<i>galI-18</i>	0	0	0	0
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>				
<i>galI-209</i>	0	150	0	1800
<u>konstitutive Mutanten</u>				
* <i>galI-BB</i>	0	305	128	885
<i>galI-1C</i>	0	891	27	1391
<i>galI-2C</i>	0	815	4	1449
<i>galI-4C</i>	0	557	23	1614
<i>galI-d</i>	0	1430	0	1500

Tabelle 3.3

Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen lexAGal1 und deren mutierten Derivaten mit VP16Gal80 im Two-Hybrid-System. Es wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von Galaktose gemessen und in munits/mg angegeben. Mit dem * sind die neuen *galI*-Mutanten markiert. Die Daten ergeben sich aus 2-3 unabhängigen Messreihen mit max. 5-10% Abweichung.

3.3.2 Komplementation der Induktion einer *GAL1*-Deletion in *K. lactis* JA6D1R

Zur Bestimmung der Induktionsaktivität in *K. lactis* wurden die mutierten *GAL1*-Allele in den *CEN*-Vektor pKATUC4 unter der Kontrolle des *PGK*-Promotors kloniert. Dieser Vektor liegt in etwa 1-2 Kopien in der Zelle vor und ermöglicht eine Beobachtung des Induktionsvermögens in niedriger Kopienzahl. Nach Transformation des *galI*-Deletionsstammes JA6D1R mit den mutierten Allelen von *GAL1* wurde die Expression der genomisch codierten β -Galaktosidase (*LAC4*) unter verschiedenen Bedingungen

gemessen (Tabelle 3.4). Der Stamm JA6D1R (*Δgal1*) zeigt mit leerem Vektor nur einen geringen Hintergrund an β -Galaktosidase-Aktivität, der auf Glukose völlig reprimiert wurde. Die leichte Erhöhung der Aktivität auf Glycerin/Laktat (dereprimiert) auf 38 munits/mg entspricht dem basalen Transkriptionsniveau der Gal4-abhängigen *GAL*-Promotoren, welches unter induzierten Bedingungen auf Glycerin/Laktat/Galaktose (46 munits/mg) kaum erhöht wurde.

<i>GAL1</i> -Allele	β -Galaktosidase-Aktivität (munits/mg)		
	niedrige Kopienzahl		
	Glukose	Glycerin/Lactat	Glycerin/Lactat/Galaktose
pKATUC4 (Vektor)	3	38	46
<i>GAL1</i> Wildtyp	27	189	2734
<u>reg⁻ Mutanten</u>			
* <i>gal1-22</i>	79	60	69
* <i>gal1-40</i>	31	65	236
* <i>gal1-HY</i>	21	40	69
* <i>gal1-37</i>	24	93	282
* <i>gal1-42</i>	20	60	536
<i>gal1-m1</i>	56	59	69
<i>gal1-m2</i>	42	66	263
<i>gal1-14</i>	5	8	136
<i>gal1-18</i>	3	7	98
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>			
<i>gal1-209</i>	87	90	1501
<u>konstitutive Mutanten</u>			
* <i>gal1-BB</i>	74	74	2349
<i>gal1-1C</i>	10	915	1386
<i>gal1-2C</i>	10	432	1163
<i>gal1-4C</i>	7	372	2987

Tabelle 3.4

Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen Gal1 und deren mutierten Derivaten mit VP16Gal80 in niedriger Kopienzahl in *K. lactis* JA6D1R. Es wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in Glukose (reprimiert), Glycerin/Lactat (dereprimiert) und Glycerin/Lactat/Galaktose (induziert) gemessen und in munits/mg angegeben. Mit dem * sind die neuen *gal1*-Mutanten markiert. Die Daten ergeben sich aus 2-3 unabhängigen Messreihen mit max. 5-10% Abweichung.

Das *GAL1*-Wildtyp-Allel unter Kontrolle des *PGK*-Promotors komplementiert die Deletion im Stamm JA6D1R. Gibt man dem Medium Galaktose hinzu, wird eine β -Galaktosidase-Aktivität von 2734 munits/mg gemessen. Unter reprimierten Bedingungen ist eine um den Faktor 20 reduzierte β -Galaktosidase-Aktivität von 27 munits/mg messbar, die sich unter dereprimierenden Bedingungen nur leicht auf 189 munits/mg erhöht. Die β -Galaktosidase-Messung der regulatorisch defekten Mutanten (Tabelle 3.4) ergab eine Aufteilung dieser Allele in zwei verschiedene Gruppen. Eine erste Gruppe von Mutanten weist noch ein basales Niveau der β -Galaktosidase-Aktivität bis 100 munits/mg auf. Zu dieser Gruppe gehören die Mutanten *gal1-m1*, *gal1-14*, *gal1-18*, *gal1-22* und *gal1-HY*, wobei *gal1-14* und *gal1-18* eine leichte Induktion zeigen. In der zweiten Gruppe von Mutanten sind alle aufgeführt, die eine schwache Induktion aufweisen können (Tabelle 3.4). Sie zeigen eine β -Galaktosidase-Aktivität von über 200 munits/mg, die nicht mehr als basales Niveau bezeichnet werden kann. Die Mutanten *gal1-m2*, *gal1-40* und *gal1-37* haben eine β -Galaktosidase-Aktivität zwischen 236-282 munits/mg und die Mutante *gal1-42* eine von 536 munits/mg (Tabelle 3.4). Diese Aktivitäten sind etwa um den Faktor 5-10 im Vergleich zum Wildtyp-Protein erniedrigt, jedoch um den Faktor 3-6 höher als das basale Niveau der β -Galaktosidase-Aktivität in diesem Stamm. Diese Resultate zeigen, dass die in *S. cerevisiae* gemessenen Interaktionsdefekte sich in *K. lactis* als Regulationsdefekte herausstellen. Betrachtet man die konstitutiven Mutanten im Zusammenhang mit den Resultaten des Two-

Hybrid-Systems, würde man erwarten, dass diese Gruppe in der Lage wäre, eine Induktion der β -Galaktosidase-Aktivität auf Glukose zu vermitteln. Dies ist jedoch nicht der Fall. Auf Glukose ist lediglich bei der Mutante *gall-BB* ein basales Niveau erkennbar. Die Mutanten *gall-1C*, *gall-2C* und *gall-4C* haben mit 7-10 munits/mg eine nahezu vernachlässigbare β -Galaktosidase-Aktivität. Die Mechanismen der Glukose-Repression sind dominant gegenüber der konstitutiven Induktion dieser Allele. Entfernt man Glukose aus dem Medium und ersetzt es durch Glycerin/Laktat, ist der konstitutive Phänotyp der Mutanten *gall-1C*, *gall-2C* und *gall-4C* jedoch wieder erkennbar (Tabelle 3.4). Die Mutante *gall-BB* kommt über das basale Niveau nicht hinaus. Gibt man dem Medium Galaktose hinzu, ist bei den Mutanten *gall-4C* und *gall-BB* eine Steigerung der Aktivität auf das Wildtyp-Niveau zu beobachten. Die Mutanten *gall-1C* und *gall-2C* bleiben um den Faktor 2 darunter.

3.3.3 Wachstum auf Galaktose im *GAL1*-Deletionsstamm JA6D1R

Die meisten neu isolierten regulationsdefekten Mutanten zeigten überraschenderweise ein Wachstum auf Galaktose (Tabelle 3.5). Lediglich die Mutante *gall-37* konnte, wie die bereits in *K. lactis* auf einen Regulationsdefekt selektierten Mutanten (*gall-m1*, *gall-m2*, *gall-14* und *gall-18*), nicht auf Galaktose wachsen. Offensichtlich ist die Höhe der gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität kein Maßstab für die Aktivität des gesamten Galaktoseverwertungsweges. Die Promotoren der verschiedenen *GAL*-Gene sind nicht gleich. Vermutlich liegt die Aktivierung von einem oder mehreren Genen unter dem Niveau, welches noch Wachstum auf Galaktose ermöglicht. Alle konstitutiven Mutanten zeigten ein wildtyp-ähnliches Wachstum auf Galaktose. Das Allel *gall-209* bewirkt kein Wachstum. (Tabelle 3.5). Wie bei Vollenbroich *et al.* (1999) beschrieben, ist dieses Allel nur regulatorisch aktiv und besitzt keine Galaktokinase-Funktion. Dies bedeutet, dass alle JA6D1R (Δ *gall*) komplementierenden Allele sowohl eine regulatorische Funktion als auch eine Kinase-Funktion aufweisen.

<i>GAL1</i> -Allele	Wachstum auf Galaktose	
	<i>K. lactis</i> JA6D1R (Δ <i>gall</i>)	
	Glukose	Galaktose
pKATUC4 (Vektor)	+	-
<i>GAL1</i> Wildtyp	+	+
reg⁻ Mutanten		
* <i>gall-22</i>	+	+
* <i>gall-40</i>	+	+
* <i>gall-HY</i>	+	+
* <i>gall-37</i>	+	-
* <i>gall-42</i>	+	+
<i>gall-m1</i>	+	-
<i>gall-m2</i>	+	-
<i>gall-14</i>	+	-
<i>gall-18</i>	+	-
reg⁺ kin⁻ Mutanten		
<i>gall-209</i>	+	-
konstitutive Mutanten		
* <i>gall-BB</i>	+	+
<i>gall-1C</i>	+	+
<i>gall-2C</i>	+	+
<i>gall-4C</i>	+	+

Tabelle 3.5

Komplementation des *K. lactis* *GAL1*-Deletionsstamm JA6D1R mit den mutierten *GAL1*-Allele auf Galaktose-haltigen Agarplatten.
 ++ Wachstum
 - kein Wachstum
 * neue Mutanten

3.3.4 Galaktokinase-Test in *S. cerevisiae* α MZ4 ($\Delta gal1$) und *K. lactis* 22A295-1 (*gal1-209*)

Zur Untersuchung der Galaktokinase-Funktion wurden die mutierten *GAL1*-Allele in den Stämmen *S. cerevisiae* α MZ4 ($\Delta gal1$) und *K. lactis* 22A295-1 (*gal1-209*) bezüglich ihrer Komplementation auf Galaktose getestet. Der *S. cerevisiae*-Stamm α MZ4 kann nur auf Galaktose wachsen, wenn die *GAL1*-Deletion durch ein Galaktokinase-aktives Allel komplementiert wird. Der Stamm enthält eine genomische Kopie von *GAL3*, das für die regulatorische Funktion codiert. Der *K. lactis*-Stamm 22A295-1 ist der ursprüngliche Galaktokinase-negative Stamm, in dem das mutierte Allel *gal1-209* identifiziert worden ist (Riley und Dickson, 1984). Dieses Allel weist eine intakte regulatorische Funktion auf, hat aber keine Galaktokinase-Funktion (Meyer *et al.*, 1991). Nach Transformation mit den mutierten Allelen kann somit die Galaktokinase-Funktion durch Wachstum auf Galaktose-haltigen Agarplatten direkt bestimmt werden.

<i>GAL1</i> -Allele	Wachstum auf Galaktose	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>
	α MZ4 ($\Delta gal1$)	22A295-1 (<i>gal1-209</i>)
Vektor (pBTM116/pKATUC4)	-	-
<i>GAL1</i> Wildtyp	+	+
<u>reg⁻ Mutanten</u>		
* <i>gal1-22</i>	+	+
* <i>gal1-40</i>	+	+
* <i>gal1-HY</i>	-	-
* <i>gal1-37</i>	-	+
* <i>gal1-42</i>	-	+
<i>gal1-m1</i>	+	+
<i>gal1-m2</i>	+	+
<i>gal1-14</i>	+	+
<i>gal1-18</i>	+	+
<u>reg⁺ kin⁻ Mutante</u>		
<i>gal1-209</i>	-	-
<u>konstitutive Mutanten</u>		
* <i>gal1-BB</i>	+	+
<i>gal1-1C</i>	+	+
<i>gal1-2C</i>	+	-
<i>gal1-4C</i>	+	+

Tabelle 3.6

Galaktokinase-Test der mutierten *GAL1*-Allele in den Stämmen *S. cerevisiae* α MZ4 ($\Delta gal1$) und *K. lactis* 22A295-1 (*gal1-209*). Das Wachstum wurde auf Galaktose-haltigen Agarplatten ermittelt.
 + Wachstum
 - keine Wachstum
 * neue Mutanten

Die ersten Galaktokinase-Tests wurden in dem Stamm α MZ4 ($\Delta gal1$) gemacht, da man hier mit den Two-Hybrid-Fusionsplasmiden ohne Umklonierung die Funktion direkt testen konnte. Tabelle 3.6 zeigt, dass die neuen Mutanten *gal1-22*, *gal1-40* und *gal-BB* komplementieren, während die Mutanten *gal1-HY*, *gal1-37* und *gal1-42* kein Wachstum aufweisen. Nach Umklonierung der mutierten Allele ohne *LexA*-Fusion in den *K. lactis* *CEN*-Vektor pKATUC4 unter Kontrolle des *PGK*-Promotors wurden die Mutanten in dem Stamm 22A295-1 (*gal1-209*) getestet (Tabelle 3.6). Die neuen Mutanten *gal1-22*, *gal1-37*, *gal1-40*, *gal1-42* und *gal1-BB* können den Galaktokinasedefekt komplementieren, die Mutante *gal1-HY* jedoch nicht.

Wie aus der Tabelle 3.7 ersichtlich, ergeben sich somit aus der Komplementation in *K. lactis* einige Unterschiede im Vergleich zu *S. cerevisiae*. Die Allele *gal1-37* und *gal1-42* zeigen nur in *K. lactis* eine Galaktokinase-Aktivität und sind in *S. cerevisiae* inaktiv. Möglicherweise findet eine partielle Komplementation der Punktmutation des *gal1-209* Allels statt. Ein umgekehrter Effekt ist bei dem Allel *gal1-2C* zu sehen (Tabelle 3.6).

Dieses Allel ist in *S. cerevisiae* Kinase-positiv, aber -negativ in *K. lactis*. Hier könnte eine Hemmung durch das *gal1-209* Allel vorliegen. Grundsätzlich scheint die Analyse im Two-Hybrid-System sensitiver zu sein, als dies in *K. lactis* der Fall ist. In *K. lactis* kommen verschiedene Faktoren zusammen, die den Phänotyp letztendlich ausmachen. Im Two-Hybrid-System wird nur die Interaktion der Proteine Gal1 und Gal80 getestet, daher wird nur ein kleiner Ausschnitt der *in vivo* Situation wiedergegeben.

<i>GAL1</i> -Allele	Phänotyp in	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>
<i>gal1-22</i>	reg ⁻ kin ⁺	reg ⁻ kin ⁺
<i>gal1-40</i>	reg ⁻ kin ⁺	reg ⁻ kin ⁺
<i>gal1-HY</i>	reg ⁻ kin ⁻	reg ⁻ kin ⁻
<i>gal1-37</i>	reg ⁻ kin ⁻	reg ⁻ kin ⁺
<i>gal1-42</i>	reg ⁻ kin ⁻	reg ^{+/-} kin ⁺
<i>gal1-BB</i>	konst. kin ⁺	reg ⁺ kin ⁺

Tabelle 3.7

Phänotypen der neuen *gal1*-Mutanten in *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

reg⁺ regulatorisch aktiv
 reg⁻ regulatorisch inaktiv
 kin⁺ Kinase aktiv
 kin⁻ Kinase inaktiv
 konst. konstitutiv aktiv

3.4 Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen *gal1*-Mutanten und *gal80*-Mutanten im Two-Hybrid-System

3.4.1 Two-Hybrid-Analyse mit den Gal80-S-Mutanten

Die *gal80*-S-Mutanten sind von Zenke *et al.* (1999) in *K. lactis* und von Nogi und Fukasawa (1984) in *S. cerevisiae* beschrieben worden. Die super-reprimierenden Allele von *GAL80* in *S. cerevisiae* sind nicht induzierbar. Zenke *et al.* (1999) konnten zeigen, dass nicht alle in *S. cerevisiae* beschriebenen super-reprimierenden Mutanten in *K. lactis* den gleichen Phänotyp haben. So weist die *gal80-S0*-Mutation (G302R) in *K. lactis*, im Gegensatz zum entsprechenden Allel in *S. cerevisiae*, keinen super-reprimierenden Phänotyp auf (Zenke *et al.*, 1999). Das Allel *GAL80-S1* (G324R) kann in *K. lactis* ebenfalls nicht in die Gruppe der super-reprimierten *GAL80*-Allele eingeordnet werden, weil eine Gal4- und Gal1-Expression nach Galaktose-Induktion stattfindet (Zenke *et al.*, 1999). Die Mutation *gal80-S2* (E367K) hingegen führt auch in *K. lactis* zu einem super-reprimierten Phänotyp. Die Expression der Galaktokinase und β -Galaktosidase ist sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Galaktose reprimiert (Zenke *et al.*, 1999).

In Tabelle 3.8 ist ersichtlich, dass keine der regulationsdefekten Mutanten von Gal1 in der Lage ist, mit den Gal80-Derivaten *gal80-S0*, *gal80-S1* und *gal80-S2* zu interagieren. Nur die konstitutiven Mutanten und die regulatorisch aktive, aber Kinasedefekte *gal1-209*-Mutante, die mit dem Wildtyp von Gal80 im Two-Hybrid-System interagieren konnten, tun dies auch mit dem *GAL80-S1*-Allel. Dieses Allel war das einzige, das auch mit dem Wildtyp Gal1 in Wechselwirkung treten konnte. Die Stärke der Interaktion ist jedoch etwa um den Faktor 2-3 reduziert. Einzig die Mutante *gal1-BB* hat die gleiche Affinität zum *gal80-S1* wie zum Wildtyp Gal80. Das Allel *GAL80-S0*, welches einen konstitutiven Phänotyp hat, kann jedoch nicht mehr mit Gal1 interagieren und weist somit nicht nur einen Defekt in der Gal4-Interaktion auf, sondern auch einen mit Gal1. Das super-reprimierende Allel *GAL80-S2* kann, wie schon von Zenke *et al.* (1999) *in vitro* gezeigt, im Two-Hybrid-System nicht mit dem Wildtyp Gal1 oder den *gal1*-Mutanten interagieren (Tabelle 3.8).

Zusammenfassend zeigt Wildtyp Gal1 im Two-Hybrid-System nur eine Interaktion mit dem Gal80-S1. Die regulatorisch defekten Mutanten zeigen keine Interaktion mit den

gal80-S-Mutanten, so dass in keinem Fall eine Supprimierung der Interaktionsdefekte auftritt.

β-Galaktosidase-Aktivität auf Galaktose (munits/mg)				
lexA-Fusion	hohe Kopienzahl			
	<i>VP16</i> <i>GAL80</i> Wildtyp	<i>VP16</i> <i>GAL80-S0</i>	<i>VP16</i> <i>GAL80-S1</i>	<i>VP16</i> <i>GAL80-S2</i>
pBTM116 (Vektor)	0	0	0	0
<i>GAL1</i> Wildtyp	1400	0	386	0
<u>reg⁻ kin⁺ Mutanten</u>				
<i>gal1-22</i>	0	0	0	0
<i>gal1-40</i>	0	0	0	0
<i>gal1-37</i>	0	0	0	0
<i>gal1-42</i>	0	0	0	0
<i>gal1-m1</i>	960	0	0	0
<i>gal1-m2</i>	1140	0	0	0
<i>gal1-14</i>	0	0	0	0
<i>gal1-18</i>	0	0	0	0
<u>reg⁻ kin⁻ Mutanten</u>				
<i>gal1-HY</i>	0	0	0	0
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>				
<i>gal1-209</i>	1800	0	778	0
<u>konstitutive Mutanten</u>				
<i>gal1-BB</i>	2218	0	1904	0
<i>gal1-1C</i>	1663	0	609	0
<i>gal1-2C</i>	1169	0	741	0
<i>gal1-4C</i>	1667	0	587	0
<i>gal1-d</i>	1544	0	612	0

Tabelle 3.8

Two-Hybrid-Analyse der *gal1*-Mutanten mit den *gal80*-Mutanten S0, S1 und S2. Es sind lediglich die Aktivitäten auf Glukose/Galaktose angegeben. Die Daten ergeben sich aus 2-3 unabhängigen Messreihen mit max. 5-10% Abweichung.

3.4.2 Two-Hybrid-Analyse mit der Gal80-R10-Mutante

Mutationen in den Interaktionsdomänen können oft Interaktionsdefekte supprimieren und dadurch zur Identifizierung der Interaktionsbereiche führen. So hat Menezes in unserem Labor (pers. Mitteilung) die Mutante *gal80-R10* (M366V) isoliert. Sie liegt in direkter Nachbarschaft zum Austausch des Allel *gal80-S2* (E367K), hat aber einen anderen Phänotyp. Im Two-Hybrid-System supprimiert sie den Interaktionsdefekt der Mutante *gal1-18*. Jetzt war es interessant zu sehen, ob *gal80-R10* auch die von mir isolierten Mutanten supprimieren konnte. Zum Vergleich wurden alle bisher isolierten Mutanten mitbestimmt. Tabelle 3.9 zeigt, dass keine der Regulationsmutanten (*gal1-22*, *gal1-37*, *gal1-40*, *gal1-42* und *gal1-HY*) in dem Two-Hybrid-Assay supprimiert werden. Interessanterweise werden die Mutanten *gal1-m1* und *gal1-m2* am stärksten supprimiert. Die Two-Hybrid-Tests wurden bei Gal80-R10-Überexpression und mit dem integrierten *gal80-R10*-Allel durchgeführt. Tabelle 3.9 zeigt, dass das Wildtyp Gal1 bei Gal80-R10-Überexpression eine leicht erhöhte β-Galaktosidase-Aktivität aufweist. Integriert ist für die Mutation *gal80-R10* im Vergleich zum Wildtyp-Allel eine um den Faktor 2 erhöhte Aktivität zu beobachten. Die erhöhte Aktivität wird auch bei den regulationsdefekten Mutanten *gal1-m1* und *gal1-m2* und bei der Kinase inaktiven Mutanten *gal1-209* gemessen.

β-Galaktosidase-Aktivität auf Galaktose (munits/mg)				
lexA-Fusion	integriert		hohe Kopienzahl	
	<i>VP16</i> <i>GAL80</i> Wildtyp	<i>VP16</i> <i>GAL80-R10</i>	<i>VP16</i> <i>GAL80</i> Wildtyp	<i>VP16</i> <i>GAL80-R10</i>
pBTM116 (Vektor)	0	0	0	0
<i>GAL1</i> Wildtyp	510	1054	1400	1584
<u>reg⁻ kin⁺ Mutanten</u>				
<i>gal1-22</i>	0	0	0	0
<i>gal1-40</i>	0	0	0	0
<i>gal1-37</i>	0	0	0	0
<i>gal1-42</i>	0	0	0	0
<i>gal1-m1</i>	0	769	960	1611
<i>gal1-m2</i>	100	797	1140	1687
<i>gal1-14</i>	0	4	0	2
<i>gal1-18</i>	0	21	0	187
<u>reg⁻ kin⁻ Mutanten</u>				
<i>gal1-HY</i>	0	0	0	0
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>				
<i>gal1-209</i>	150	1173	1800	2596

Tabelle 3.10 zeigt, dass auch bei den konstitutiven Mutanten eine erhöhte Affinität zum mutierten Allel *GAL80-R10* vorliegt. Die konstitutiven Mutanten stellen eine besondere Gruppe von *gal1*-Mutanten dar. Sie ermöglichen eine Interaktion mit Gal80, die unabhängig ist von Galaktose. In Anwesenheit von Galaktose zeigen die konstitutiven Allele ebenfalls eine höhere Affinität für *gal80-R10*. Eine interessante Ausnahme bieten die Mutanten *gal1-BB* und *gal1-1C*, die auf Glukose bei Überexpression des *GAL80-R10*-Allels eine 5-fache höhere Aktivierung als mit dem Wildtyp Gal80 zeigen. Die betreffenden Aminosäureaustausche in *GAL1-BB* (E321G/L341P) und *GAL1-1C* (L391F) scheinen einen direkten Einfluß auf die Struktur des Proteins zu haben.

Mit dem integrierten Allel von *GAL80-R10* ist auf Galaktose, eine um den Faktor 2-5 höhere β-Galaktosidase-Aktivität als mit dem Wildtyp Gal80 erkennbar. Lediglich die Mutante *gal1-d*, die mit dem Wildtyp Gal80 nur in *K. lactis* einen konstitutiven Phänotyp hat (Vollenbroich *et al.*, 1999), zeigt eine Aktivität, die dem Wildtyp Gal1 entspricht. Überraschenderweise zeigen die Allele *gal1-1C* und *gal1-2C* in Anwesenheit von Galaktose mit integriertem Gal80-R10 eine höhere Aktivität als mit überexprimiertem Gal80-R10. Dies kann nicht plausibel erklärt werden, da bisher immer mit überexprimiertem Gal80 eine höhere Aktivität gemessen werden konnte.

Desweiteren kann festgehalten werden, dass ausschliesslich bei Überexpression von Gal80, der Bedingung, worunter die konstitutiven Mutanten isoliert wurden, eine Interaktion mit Gal80-R10, unabhängig von Galaktose, vermittelt werden kann. Bei niedriger Expression von Gal80 und Gal80-R10 ist die Interaktion nicht messbar. Mit Ausnahme von *gal1-d* zeigen alle Allele eine erhöhte Aktivierung mit *gal80-R10*.

Tabelle 3.9

Two-Hybrid-Analyse der regulatorisch-defekten und Kinase inaktiven *gal1*-Mutanten mit der *gal80*-Mutante R10. Es sind lediglich die Aktivitäten auf Glukose/Galaktose angegeben, in Überexpression und integriert. Die Daten ergeben sich aus 2-3 unabhängigen Messreihen mit max. 5-10% Abweichung.

β-Galaktosidase-Aktivität (munits/mg)								
lexA-Fusion	integriert				hohe Kopienzahl			
	VP16GAL80		VP16GAL80-R10		VP16GAL80		VP16GAL80-R10	
	Glu	Glu/ Gal	Glu	Glu/ Gal	Glu	Glu/ Gal	Glu	Glu/ Gal
pBTM116 (Vektor)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>GAL1</i> Wildtyp	0	510	0	1054	0	1400	0	1584
<u>konstitutive Mutanten</u>								
<i>gal1-1C</i>	0	891	4	1948	27	1391	178	1663
<i>gal1-2C</i>	0	815	0	2403	4	1449	1	1169
<i>gal1-4C</i>	0	557	0	1048	23	1614	0	1667
<i>gal1-d</i>	0	1430	0	1143	0	1500	0	1544
<i>gal1-BB</i>	0	305	0	1508	128	885	748	2218

Tabelle 3.10

Two-Hybrid-Analyse der konstitutiven *gal1*-Mutanten mit der *gal80*-Mutante R10. Es sind die Aktivitäten auf Glukose und Glukose/Galaktose angegeben, in Überexpression und integriert. Die Daten ergeben sich aus 2-3 unabhängigen Messreihen mit max. 5-10% Abweichung.

3.5 Identifizierung von Interaktionsdomänen durch Protein-Crosslinking und Protease-Verdau

Um Komplexe von Proteinen im Detail studieren zu können, ist es hilfreich diese Komplexe in einer bestimmten Situation fixieren zu können. Bisher haben wir lediglich die Interaktion von Gal1 und Gal80 in bestimmten Bereichen des N-terminus und C-Terminus im Two-Hybrid-System festlegen können. Um diese Bereiche auf ganz bestimmte Aminosäuren beschränken zu können, kann man den Komplex kristallisieren oder durch Protein-Crosslinking und tryptischen Verdau im Massenspektrum analysieren. In der vorliegenden Arbeit werden beide Methoden zur Identifizierung spezifischer Interaktionsstellen zwischen den Proteinen Gal1 und Gal80 angewendet.

3.6.1 Gal1- und Gal80-Crosslinking mit Formaldehyd *in vivo*

Eine Methode, Proteine miteinander kovalent zu vernetzen, ist das *in vivo*-Crosslinking mit 1% Formaldehyd (Maniatis *et al.*, 1982). Da wir die Interaktion der Fusionproteine lexAGal1 und VP16Gal80 im Two-Hybrid-Stamm CTY10-5d bereits nachweisen konnten, sollte dieser Stamm für das Crosslinking mit Formaldehyd verwendet werden. Der Stamm CTY10-5d wurde mit den Plasmiden plxAGal1 und pVKG80 co-transformiert und in Anwesenheit von Galaktose angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde dem Medium 1% Formaldehyd hinzugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 300 mM Glycin wurden die Zellen gewaschen und der Proteinrohextrakt nach Zellaufschluss isoliert. Die Proteinrohextrakte wurden dann in einer Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen LexA untersucht (Abbildung 3.4). Spur 1 zeigt, dass der Rohextrakt des Stammes CTY10-5d ohne Plasmide mit dem monoklonalen Antikörper gegen LexA kein Signal ergibt. In der Spur 2 (Stamm CTY10-5d/plxAGal1) ist die lexAGal1-Bande auf Höhe der erwarteten 84 kD sichtbar. Dies deckt sich mit dem Befund von Vollenbroich (1998), dass lexAGal1 im Two-Hybrid-System keine Dimere bildet. In Spur 3 (CTY10-5d/pVKG80) ist kein Signal erkennbar. Mit einem Antikörper sowohl gegen Gal80 als auch gegen die VP16-Aktivierungsdomäne konnte die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Spur 4 (CTY10-5d/plxAGal1 und pVKG80) zeigt nun eine Vielzahl von möglichen Crosslinking-Produkten in dem Schmier oberhalb der spezifischen lexAGal1-Bande. Ein mögliches Crosslinking-Produkt aus jeweils einem Molekül, lexAGal1 (Laufhöhe 84kD) und

VP16Gal80 (Laufhöhe 80 kD), sollte auf einer Höhe von ca. 164 kD zu sehen sein. Auf dieser Höhe ist, wie in Abbildung 3.4 gezeigt eine Bande erkennbar. Da bekannt ist, dass Gal80 dimerisieren kann (Melcher 2001), kann die nächstfolgende sichtbare Bande in dem Schmier als ein Komplex mit einem Molekül lexAGal1 und zwei Molekülen VP16Gal80 gedeutet werden. Die erwartete Laufhöhe dieses Komplexes liegt bei 244kD und entspricht der in der Abbildung 3.6 markierten Bande lexAGal1/VP16Gal80₂*. Oberhalb von 244kD sind noch einige weitere Banden zu erkennen. Timson *et al.* (2002) konnten zeigen, dass Gal3 und Gal80 in einem stöchiometrischen Verhältnis miteinander interagieren. Wenn Gal80 dimerisiert und jedes Molekül Gal80 mit einem Molekül Gal1 interagiert, sind auch Vierer-Komplexe möglich (Gal1₂/Gal80₂*), die einer Größe von etwa 328 kD entsprechen. Da in dem vorliegenden 7,5%igen Gel Protein-Komplexe dieser Größe nicht mehr aufgetrennt werden können, müsste dieser wahrscheinlich in dem Schmier zu finden sein.

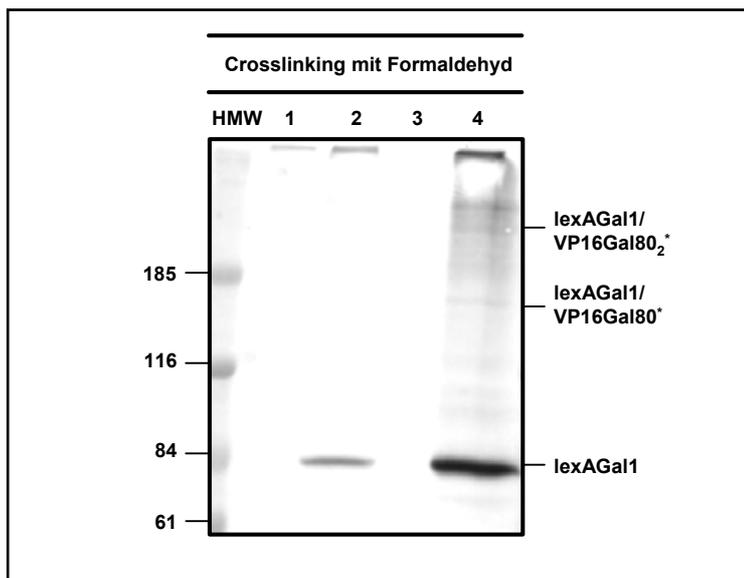


Abbildung 3.4

Western-Analyse des Protein-Crosslinking mit 1% Formaldehyd in dem Stamm CTY10-5d. Die Proteinrohextrakte wurden aus CTY10-5d Zellen präpariert und mit einem monoklonalen LexA-Antikörper untersucht. Spur 1 – CTY10-5d ohne Plasmide, 2 – CTY10-5d mit plxAGal1, 3 – CTY10-5d mit pVKG80, 4 – CTY10-5d mit plxAGal1 und pVKG80. * Crosslinking Produkte. Der Gellauf erfolgte in einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Als Standard wurde der HMW (high molecular weight standard)-Marker verwendet.

Für einen tryptischen Verdau und eine massenspektroskopische Untersuchung sind diese Banden jedoch zu sehr in dem Schmier eingebettet. Der Hintergrund ist zwar ein gutes Merkmal für eine positive Crosslinking-Reaktion, muss aber für eine massenspektroskopische Untersuchung vermindert werden, um spezifische Protein-Komplexe isolieren zu können. Daher sollte im nächsten Versuch jeweils eines der Proteine aufgereinigt werden und mit einem spezifischeren Crosslinker, einem sogenannten 0Å-Crosslinker, vernetzt werden. Diese Art von Crosslinkern haben den Vorteil, dass sie nur stabile Protein-Komplexe kovalent miteinander verknüpfen.

3.6.2 Protein-Crosslinking von Gal1 und Gal80 *in vitro* mit einem 0Å-Crosslinker

Das Protein-Crosslinking mit einem 0Å-Crosslinker ermöglicht, Protein-Komplexe, die direkt in Wechselwirkung treten, spezifisch miteinander zu verknüpfen. Der hier verwendete Crosslinker basiert auf der von Brown *et al.* (1995) entwickelten Methode. Dabei bildet ein Tripeptid (GlyGlyHis) mit Nickel(II)-Ionen einen Komplex, welcher nach Aktivierung mit Monoperoxyphthalsäure (MMPP) ein oxidatives Crosslinking spezifisch bindender Protein-Komplexe vermittelt (Abbildung 2.5). Der aktivierte Komplex, bestehend aus dem Tripeptid und Nickel(II) entzieht in direkter Nähe befindlichen aromatischen Aminosäuren ein Elektron und bewirkt ein Crosslinking dieses aromatischen Restes mit einem weiteren aromatischen Rest. Dies kann intramolekular geschehen, aber auch intermolekular mit spezifisch bindenden Proteinen.

Diese Methode kann auch bei 6xHis-getagten Proteinen verwendet werden. Der 6xHis-Tag ersetzt in diesem Falle das Tripeptid und hat auch eine Affinität zum Nickel(II). Diese Methode hat den Vorteil, dass die Proteine zunächst über Nickel-NTA

aufgereinigt werden können um dann anschließend *in vitro* miteinander kovalent vernetzt zu werden. Alternativ kann man die 6xHis-getaggtten Proteine an die Nickel-NTA-Säule immobilisieren und mit einem Proteinrohextrakt inkubieren, der Nickel(II)-Acetat und MMPP enthält. Die beiden letztgenannten Methoden wurden mit 6xHis-getaggttem Gal1 und 6xHis-getaggttem Gal80 aus *K. lactis* durchgeführt. Leider führten diese Versuche zu keinem Resultat. Versuche mit GST-6xHis-Gal3 und GST-6xHis-Gal80 aus *S. cerevisiae* in Kooperation mit K. Melcher (Universität Frankfurt) führten ebenfalls zu keinem Resultat. Wir gingen daher dazu über, wie schon in dem Versuch zuvor, das Crosslinking mit den Fusionsproteinen lexAGal1 und VP16Gal80 aus dem Stamm CTY10-5d unter Verwendung des Tripeptids zu machen. Um eines der beiden Proteine zu isolieren, wurden die Fusionsproteine jeweils an Latex-Beads mit ProteinA immobilisiert, die zuvor mit spezifischen Antikörpern gegen LexA oder VP16 inkubiert wurden. Die Antikörper haben eine natürliche Affinität zum ProteinA und binden relativ stark an das ProteinA. Diese modifizierten Latex-Beads wurden mit Proteinrohextrakten, die lexAGal1 oder VP16Gal80 enthielten, inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten führte dies zu dem Resultat, dass das jeweilige Fusionsprotein an den Latexbeads über die Antikörper immobilisiert wurde (Abbildung 2.1). In einem weiteren Schritt wurden die Latex-Beads mit einem weiteren Rohextrakt aus dem Stamm CTY10-5d, der nun LexAGal1 enthielt, bei immobilisiertem VP16Gal80 oder VP16Gal80 bei immobilisierten LexAGal1 in Anwesenheit von Galaktose und ATP inkubiert und anschließend mit dem Komplex GlyGlyHis-Nickel(II) und MMPP versetzt. Das Crosslinking wurde dann nach kurzer Reaktionszeit (5 min) mit SDS-Blaumarker bei 95°C gestoppt und die Proteine eluiert.

In Abbildung 3.5A sind die Vernetzungsversuche von VP16Gal80 mit immobilisiertem lexAGal1 dargestellt. In dem ersten Blot, der mit dem monoklonalen LexA-Antikörper entwickelt wurde, ist in Spur 1 die lexAGal1-Bande erkennbar. In Spur 3 (Gal1/Gal80/Crosslinker) sollten neben einem lexAGal1-Signal auch Crosslinking-Produkte mit VP16Gal80 erkennbar sein. Dies ist aber nicht der Fall, man muss daher annehmen, dass der monoklonale LexA-Antikörper nicht an das ProteinA der Latex-Beads gebunden hat. Verschiedentlich gibt es Antikörper, die aus der Maus gewonnen werden, die nicht an ProteinA binden können, da sie speziell für Western-Blot-Analysen generiert werden. Da es keinen LexA-Antikörper gibt, der für Immunpräzipitationen verwendet werden kann, wurde zunächst der Versuch mit immobilisiertem VP16Gal80 fortgesetzt. Versuche mit spezifischen Antikörpern gegen Gal1 zur Immobilisierung des LexAGal1 würde zu vielen Crossreaktionen mit anderen Hefe-Proteinen zur Folge haben. In der Abbildung 3.5B ist das Crosslinking mit immobilisiertem VP16Gal80 dargestellt. Nach Inkubation der Latex-Beads mit den polyklonalen Antikörpern gegen VP16 und dem Rohextrakt mit VP16Gal80 wurde der Ansatz über Nacht mit einem zweiten Rohextrakt aus dem Stamm CTY10-5d versetzt, der lexAGal1 mit Galaktose (2 mM) und ATP (2 mM) enthielt. Nach der Inkubation wurde der Suspension das Tripeptid GlyGlyHis im Komplex mit Nickel(II) hinzugegeben. Der Start der Crosslinking-Reaktion erfolgte nach Zugabe der Persäure Monoperoxyphthalsäure (MMPP). Nach 5 min Inkubation wurde die Reaktion mit SDS-Blaumarker bei 95°C gestoppt und die Komplexe eluiert. Nach erfolgter Western-Blot-Analyse konnte zunächst nach Entwicklung mit dem LexA-Antikörper in Spur 1 (Gal1) und 3 (Gal1/Gal80/Crosslinker) ein starkes Signal von lexAGal1 beobachtet werden mit einem leichten Schmier in Spur 3 oberhalb von lexAGal1. Da die Beads mit spezifischem Antikörper gegen VP16Gal80 behaftet waren, ist anzunehmen, dass lexAGal1 über VP16Gal80 an die Latex-Beads gebunden hatten. Dies bestätigte sich nach der Entwicklung mit dem VP16-Antikörper. In der Spur 3 (Gal1/Gal80/Crosslinker) des zweiten Blots der Abbildung 3.7B sind Signale von VP16Gal80 erkennbar und zudem ein starker Schmier im oberen Drittel des Blots. Spezifische Banden der Crosslinking-Produkte der Proteine lexAGal1 und VP16Gal80 sind jedoch nicht erkennbar. Neben diesen beiden Methoden des Crosslinking, wurden weitere Crosslinker verwendet, die aber zu keinem besseren Resultat geführt haben. In verschiedenen Stamm-Hintergründen wurden alternativ die Crosslinker DTSP [Lomant's reagent, Dithiobis(succinimidylpropionate) von Clontech] und SASE [Succinic-acid-N-hydroxysuccinimid ester von ICN] verwendet.

Da das Vernetzen der beiden Proteine Gal1 und Gal80 nicht befriedigend funktioniert hat, wurden aufgereinigte Fraktionen von 6xHisGal1 und 6xHisGal80 ohne Crosslinker

in Anwesenheit von Galaktose und ATP inkubiert und mit ausreichend α -Chymotrypsin verdaut. Durch die Interaktion beider Proteine werden Bereiche, die involviert sind, vor dem Protease-Verdau geschützt (Protease-Schutz-Experiment).

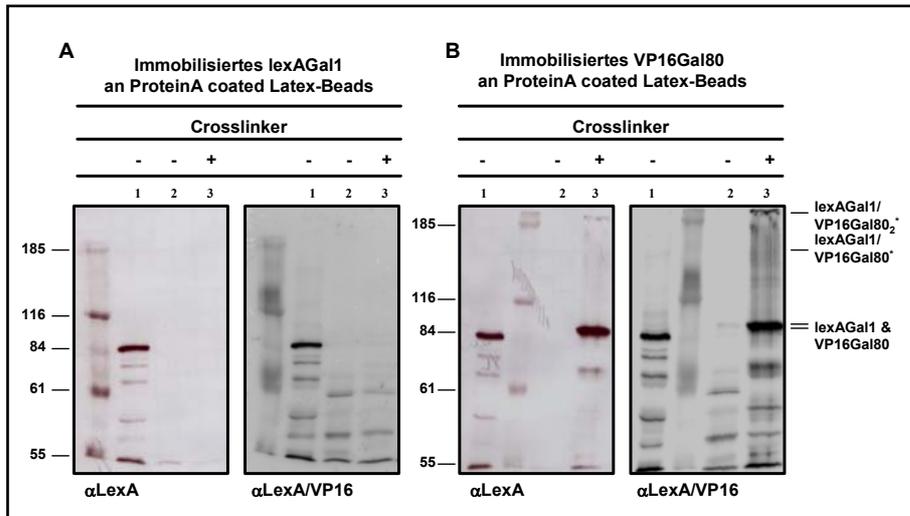


Abbildung 3.5

Western-Analyse des Protein-Crosslinking mit MMPP nach Aufreinigung und Immobilisierung an Latex-Beads von einem der beteiligten Proteine, lexAGal1 oder VP16Gal80 aus dem Stamm CTY10-5d. **A:** lexAGal1 wurde an Latex-Beads immobilisiert und mit einem Rohextrakt, der VP16Gal80 enthielt, vernetzt. Spur 1 – CTY10-5d mit plxAGal1, 2 – CTY10-5d mit pVKG80, 3 – immobilisiertes lexAGal1 an den Latex-Beads und VP16Gal80 aus dem Rohextrakt von CTY10-5d, transformiert mit pVKG80. **B:** VP16Gal80 wurde an Latex-Beads immobilisiert und mit einem Rohextrakt, der lexAGal1 enthielt, vernetzt. Spur 1 – CTY10-5d mit plxAGal1, 2 – CTY10-5d mit pVKG80, 3 – immobilisiertes VP16Gal80 an den Latex-Beads und lexAGal1 aus dem Rohextrakt von CTY10-5d, transformiert mit plxAGal1. Die Entwicklung der Blots erfolgte zunächst mit dem monoklonalen LexA-Antikörper. Nach Entfernung („stripping“) dieser Antikörper von der Membran erfolgte eine zweite Entwicklung mit dem polyklonalen VP16-Antikörper. * Crosslinking-Produkte. Der Gellauf erfolgte in einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Als Standard wurde der HMW-Marker verwendet.

3.6.3 Protease-Schutz-Experiment mit α -Chymotrypsin

Protease-Schutz-Experimente mit Gal3 und Gal80 aus *S. cerevisiae* (Timson *et al.*, 2002) bestätigten die bisherigen Daten, dass die Region 302-367 von Gal80 hauptsächlich an der Interaktion beteiligt ist. Timson *et al.* (2002) zeigten, dass ein Fragment von Gal80, welches mit der Aminosäure 332 beginnt, während der Wechselwirkung mit Gal3 besonders geschützt ist. Daraus schlossen die Autoren, dass die Region um die Aminosäure 331 an der Interaktion mit Gal3 beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Experiment für Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* durchgeführt. Aufgereinigte Fraktionen von 6xHisGal1 und 6xHisGal80 wurden zunächst mit verschiedenen Konzentrationen der Protease α -Chymotrypsin behandelt. Es sollte eine geeignete Aktivität gefunden werden, bei der die Proteine Gal1 und Gal80 zwar weitestgehend verdaut werden, aber noch ausreichend quantifizierbare Banden erzeugen. α -Chymotrypsin ist eine Serin-Protease, die Peptidbindungen mit aromatischen oder langen hydrophoben Seitenketten (Tyr, Trp, Phe, Met) am Carboxy-terminalen Ende hydrolysiert.

Abbildung 3.6 zeigt, dass in beiden Protein-Fractionen ein etwa 40 kD grosses Fragment erzeugt wird, welches erst bei höheren Protease-Konzentrationen verschwindet. Das Fragment in der 6xHisGal80-Fraktion ist etwas kleiner, als das in der 6xHisGal1-Fraktion. Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich, existiert ein geringer Laufunterschied. Somit scheint dieses Fragment ein spezifisches Abbau-Produkt des jeweiligen Proteins zu sein. Die 6xHisGal80-Fraktion zeigt bei der 30-min-Inkubation bei 30°C ohne Protease weitere Abbau-Produkte. Zwei starke Banden mit einer Grösse von 36 kD und 12 kD sind wahrnehmbar. In der 6xHisGal1-Fraktion ist Ähnliches zu

Die Proben in den Spuren 15-27 wurden, bevor sie mit α -Chymotrypsin versetzt wurden, für eine Stunde bei 30°C inkubiert, damit sich Komplexe von Gal1 und Gal80 bilden konnten. In Spur 26 ist die Probe aufgetragen, in der alle Faktoren für eine Interaktion der beiden Proteine Gal1 und Gal80 vorhanden waren. Es ist festzustellen, dass die Vorinkubation zu einer veränderten Bandenintensität geführt hat. Man würde erwarten, dass einige Banden durch die Protektion des Bindungspartners eine geringere Intensität zeigen würde. Aber es ist deutlich ein Anstieg der Intensität bei den bereits erwähnten Fragmenten mit der Grösse 36 kD und 12 kD der Gal80-Fraktion und 22 kD der Gal1-Fraktion erkennbar. Es scheint, als würden die Bruchstücke, die auch Protease-unabhängig entstehen, in der Lösung miteinander interagieren und sich dadurch gegen die Protease zu schützen. In den Spuren 23 (-ATP; -Galaktose), 24 (+ATP; -Galaktose) und 25 (-ATP; +Galaktose) sind deutlich schwächere Intensitäten dieser Banden erkennbar. Die 36 kD und 12 kD Fragmente der Gal80-Fraktion, scheinen mit denen von Timson *et al.* (2002) gefundenen, geschützten Fragmente aufgrund der Grösse identisch zu sein. Beide Proteine, Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* weisen in diesem Bereich grosse Homologien auf. Somit kann wahrscheinlich auch hier bestätigt werden, dass die Region um Aminosäure 331 in dem Bereich 302-367 an der Interaktion mit Gal1 beteiligt ist. Das 22 kD-Fragment der Gal1-Fraktion, welches wie schon zuvor gezeigt, in Abwesenheit von ATP verdaut wird, ist unter den Bedingungen in Spur 26 (+ATP; +Galaktose; +Gal1; +Gal80) besonders stabilisiert. Dieses Fragment scheint nach wie vor in der Lage zu sein, ATP zu binden. Die ATP-Binde-Region liegt in dem Bereich der Aminosäuren 140-161. Zwei Möglichkeiten können sich daraus ergeben. Erstens, dieses Fragment stabilisiert sich durch die Bindung von ATP und wird unempfindlich für die Protease oder zweitens, nach Bindung von ATP wird ein Fragment von Gal80 gebunden und schützt den Bereich vor einem Proteaseverdau. Sollte die zweite Möglichkeit zutreffend sein, müsste ein Gal80-spezifisches Fragment vorhanden sein, welches auch in Anwesenheit von ATP stabilisiert wird und in Abwesenheit von ATP verschwindet. Dies scheint tatsächlich der Fall zu sein. In den Spuren 23 (-ATP; -Galaktose), 24 (+ATP; -Galaktose), 25 (-ATP, +Galaktose) und 26 (+ATP, +Galaktose) ist ein Fragment der Grösse 25 kD erkennbar, welches in Abwesenheit von ATP (Spur 23 und 25) eine geringere Intensität aufweist. Dieses Fragment ist in den Gal80 enthaltenden Proben ohne Vorinkubation (Spuren 2,4,5 und 10-13) mit einer relativ konstanten Bandenintensität zu beobachten und ist eine der hauptsächlichen Banden, die bei einem Protease-Verdau von Gal80 entstehen. Die Wahrscheinlichkeit liegt also nahe, dass diese beiden Protein-Fragmente miteinander in Wechselwirkung treten können und sich so gegen die Protease schützen. Zwei weitere Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 19 kD und 12 kD akkumulieren in Spur 26 (+ATP; +Galaktose; +Gal1; +Gal80). Beide Fragmente sind hauptsächliche Produkte des 6xHisGal80-Verdau mit α -Chymotrypsin und werden in Abwesenheit von Gal1 (Spuren 15-17) nahezu verdaut.

Zusammenfassend kann aus dem Protease-Schutz-Experiment der Schluss gezogen werden, dass gewisse Bereiche beider Proteine nach einer Interaktion geschützt werden und aufgrund dessen in den Proben akkumulieren. Dieses Ergebnis unterscheidet sich dadurch erheblich von demjenigen von Timson *et al.* (2002) durchgeführten Protease-Schutz-Experiment. Bei letzteren konnte zum einen eine Abnahme der Bandenintensität der geschützten Bereiche beobachtet werden und zum anderen konnten sie nur geschützte Bereiche von Gal80 identifizieren.

3.7 Kristallisierung der Proteine Gal1-m1, Wildtyp Gal1 und Wildtyp Gal80: einzeln und im Komplex

In den vorhergehenden Experimenten konnten verschiedene Hinweise bezüglich potentieller Interaktionsdomänen des Proteins Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* aufgezeigt werden. Röntgen-kristallographische Strukturanalysen dieser Proteine könnten diese Informationen weitergehend vertiefen. Aus einem Röntgen-Strukturmodell mit den Positionen der einzelnen Atome kann man Rückschlüsse auf die Faltung der Polypeptidkette ziehen und eine dreidimensionale Struktur festlegen. Eine

Röntgenstruktur des Gal1/Gal80-Komplexes könnte die Interaktionsdomänen in einem dreidimensionalem Modell aufzeigen.

3.7.1 Aufreinigung der Proteine Wildtyp 6xHisGal1 und 6xHisGal1-m1

Bevor man mit Kristallisationsversuchen beginnen kann, müssen die Proteine zur Homogenität gereinigt werden. R. Engels (Dissertation, 1999) etablierte eine Aufreinigungsmethode für die Proteine Gal1 und Gal1-m1. Durch die N-terminale Fusion eines 6xHis-Tag an Gal1 konnten die Proteine über Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Erste Tests auf Kristallisation, in Zusammenarbeit mit J. Labahn des FZ-Jülich, beinhalteten nahezu 200 verschiedene Bedingungen und führten zu einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3Å. Für die Aufreinigung der Galaktokinase wurden 6xHisGal1 im *K. lactis*-Stamm MS7-62 ($\Delta adh1-4$) exprimiert. Die Verwendung dieses Stammes verhinderte eine Kontamination, die in massenspektroskopischen Analysen als Alkohol-Dehydrogenase (Adh1) aus *K. lactis* identifiziert werden konnte (Engels, 1999). Ein Nachteil dieses Stammes war jedoch die Verwendung von 100 mg/l Geneticin (G418-Sulfat) im Medium zur Selektion der Transformanten. Da sämtliche *ADH*-Gene mit einer *URA3*-Cassette deletiert wurden, konnte der eigentlich vorgesehene Selektionsmarker *URA3* nicht verwendet werden. In Uracil-Mangelmedium (YNB) mit G418-Sulfat sind die Zellen mit diesem Medium allerdings nur sehr langsam gewachsen. Nach einem Wechsel des Mediums von YNB zu 1% Casaminoacid, wuchsen die Zellen trotz des G418-Sulfats besser (1-2 Tage), und die Proteinausbeuten waren stabiler. Casaminoacid ist ein dem Vollmedium (Yeast extract) vergleichbarer Zusatz, dem lediglich einige Aminosäuren und Basen fehlen (u.a. Uracil). Nach der Aufreinigung der Galaktokinase wurde das Volumen der Proteinlösung mit Hilfe von Konzentratoren der Fa. Millipore (Centricon 30/Amicon Ultra 30) um den Faktor 30 aufkonzentriert. Dieser konzentrierten Lösung wurde ein 2-fach konzentrierter Aufbewahrungspuffer (Abschnitt 2.21.3) hinzugegeben und weiter auf eine engültige Konzentration von 10 mg/ml (1%) mit membra-spin-MINI-Säulen (membraPure, Bodenheim) aufkonzentriert. Die Proteinlösung konnte zur Stabilisierung auf 20 mg/ml aufkonzentriert und dann mit 2x Aufbewahrungspuffer mit 50% Glycerin wieder auf 1% verdünnt werden. Die Lösung enthielt dann 25% Glycerin und konnte so ohne nennenswerten Aktivitätsverlust einige Tage im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt werden. Ein Verlust der Aktivität auf etwa 50% wurde erst nach 7 Tagen beobachtet (U. Gengenbacher, pers. Mitteilung). Galaktokinase-Assays der einzelnen Aufreinigungsfractionen (Daten nicht gezeigt, U. Gengenbacher, pers. Mitteilung) ergaben eine Ausbeute an reinem Protein, die durchschnittlich bei 4-7% des gesamten Zellproteins lag. Die Protein-Präparation ergab meistens 2-4 mg reines und aktives Protein pro Präparation und lieferte daher ausreichend Protein für die Kristallisierungsversuche. Aliquots von jeder Peak-Fraktion wurden für ein SDS-Polyacrylamid-Gel in gleichem Volumen eines 2-fachen SDS-Probenpuffers bei 95°C gekocht und im Gel in Form einer Silber-Färbung oder alternativ mit Coomassie-Brilliant-Blue analysiert.

Die Coomassie-Färbung in Abbildung 3.8 A und die Silber-Färbung in Abbildung 3.8 B zeigen die Aufreinigung der Proteine 6xHisGal1 und 6xHisGal1-m1 mit Nickel-NTA-Agarose und Affi-Gel-Blue. In Abbildung 3.8 A ist nahezu die komplette Aufreinigung des Proteins Wildtyp 6xHisGal1 dargestellt. In den Spuren 1-3 sind der Rohextrakt, der auf die Nickel-NTA-Säule geladen wurde, und dessen ersten zwei Durchlaufractionen 1 und 2 zu sehen. Es ist deutlich erkennbar, dass eine Vielzahl der intrazellulären Proteine nicht an die Säule gebunden werden. In den folgenden Spuren 4-6 sind die ersten drei Waschfractionen (je 10 ml) aufgezeigt. Mit dem Waschpuffer, der eine kleine Menge an Imidazol enthält (15 mM), wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. In den Spuren 8-26 sind die einzelnen Fraktion aufgetragen, die bei der Elution mit 300 mM Imidazol gesammelt wurden (je 1 ml). Es ist deutlich zu sehen, dass fast alle Proteine in Form einer Schlagelution von der Säule gelöst wurden. Die Proteine enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt (Spur 7) und über Nacht dialysiert. In Spur 27 ist ein Aliquot der dialysierten Proteinlösung zu sehen. Nach der zweiten Aufreinigungsstufe mit der Affi-Gel-Blue-Säule konnte in der

Durchlauf fraktion 2-4 mg reines und aktives 6xHisGal1-Protein aufgefangen werden (Spur 28).

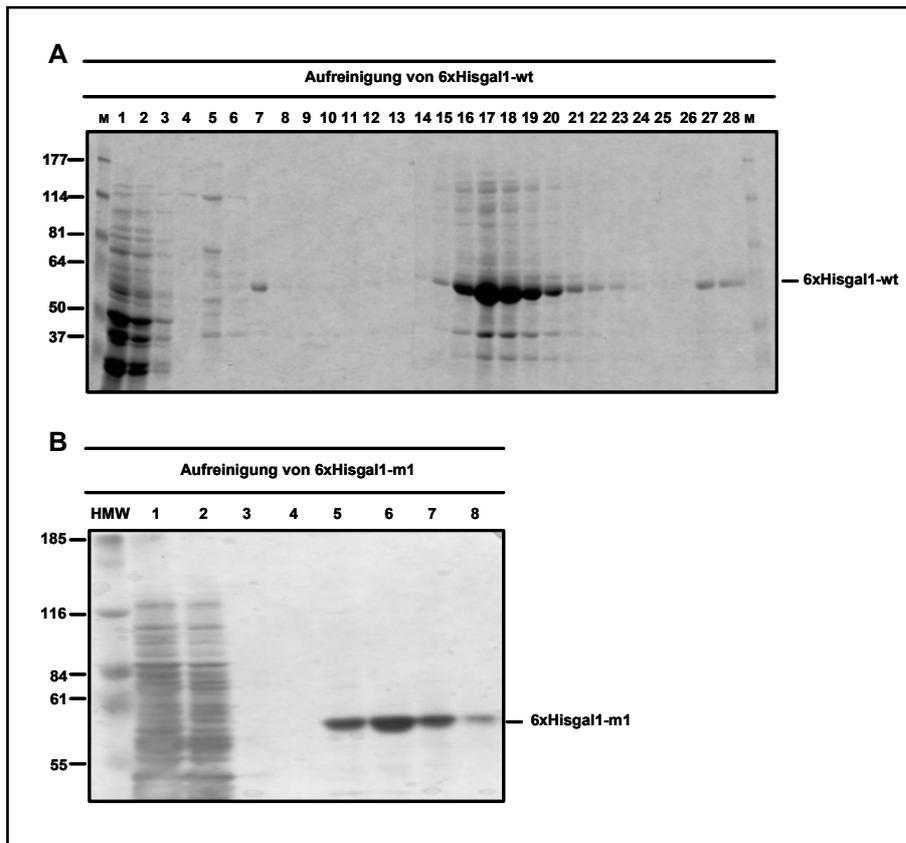


Abbildung 3.8

Dargestellt sind die Fraktionen der Protein-Aufreinigungen von 6xHisGal1-wt und 6xHisGal1-m1 aus dem *K. lactis*-Stamm MS7-62 ($\Delta adh1-4$). A: Protein-Aufreinigungen des 6xHisGal1-wt aufgetrennt im 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel und mit Coomassie angefärbt. Spur -1: Rohextrakt; -2: Durchlauf 1; -3: Durchlauf 2; -4-6: Waschfraktionen 1-3; -7: vereinigte Fraktion der ersten Elution mit 300 mM Imidazol; -8-20: alle gesammelten Fraktionen der ersten Elution á 1 ml. Die Fraktionen 14-24 wurden dann vereinigt (Spur 7); 27: Fraktion nach der Dialyse über Nacht; 28: vereinigte Durchlauf fraktion der Affi-Gel-Blue-Säule. Das aufkonzentrierte Protein wurde hier nicht aufgetragen. B: Protein-Aufreinigungen des 6xHisGal1-m1 aufgetrennt im 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel und mit Silber angefärbt. Spur -1: Rohextrakt; -2: Durchlauf 1; -3-4: Waschfraktionen 1 und 2; -5: vereinigte Fraktion der ersten Elution mit 300 mM Imidazol; -6: Fraktion nach der Dialyse über Nacht; -7: vereinigte Durchlauf fraktion der Affi-Gel-Blue-Säule; -8: aufkonzentrierte Proteinlösung von 6xHisGal1-m1.

In der Abbildung 3.8 B sind die wichtigsten Schritte der Aufreinigung von 6xHisGal1-m1 abgebildet. Die Aufreinigung erfolgte analog zur 6xHisGal1-Aufreinigung. In den Spuren 1 und 2 sind Aliquots des Rohextraktes und der ersten Durchlauf fraktion aufgetragen. Wie man in den folgenden Waschfraktionen erkennen kann (Spuren 3 und 4), ist nur noch relativ wenig unspezifisch gebundenes Protein an der Säule. Ein Großteil der Proteine ist schon im Durchlauf. In der Spur 5 und 6 sind die gesammelten Fraktionen der Schlagelution und die der anschließenden Dialyse aufgetragen. Schon jetzt ist erkennbar, dass das Protein relativ sauber ist. Nach der Affi-Gel-Blue-Säule (Spur 7) wurde dann das Proteine mit Konzentratoren eingeeengt (Spur 8). Auch hier konnten 2-4 mg reines und aktives Protein isoliert werden.

3.7.2 Aufreinigung des Proteins 6xHisGal80

Für die Aufreinigung von Gal80 wurde 6xHisGal80 (Zenke, 1995), anders als bei der Gal1-Aufreinigung im *K. lactis*-Stamm JA6D1R ($\Delta gall$), exprimiert. Der Stamm JA6D1R besitzt noch alle genomischen Kopien von *ADH1-4*. Die Aufreinigungsprozedur verlief analog zur Aufreinigungs-Methode von 6xHisGal1 und unterschied sich nur in der Anzucht der Zellen. Die Zellen von JA6D1R konnten ohne G418-Sulfat in Uracil-Mangelmedium (YNB) gut angezogen werden. Da im Mangelmedium weniger Proteine in der Zelle exprimiert werden als in Casaminoacid-Medium, konnten so viele unspezifisch bindende Proteine ferngehalten werden.

Die Problematik der Adh1-Kontaminationen konnte in der 6xHisGal80-Aufreinigung relativ elegant gelöst werden. Nach der Nickel-NTA-Aufreinigung waren zwei Banden zu erkennen (Abbildung 3.9 A), zum einen die Adh1-Kontaminationen mit einem Molekulargewicht von etwa 32-35 kD und zum anderen 6xHisGal80 mit einem Molekulargewicht von 48 kD. Die Trennung dieser beiden Protein-Fraktionen erfolgte durch die Affi-Gel-Blue-Säule. Das Protein 6xHisGal80 bindet im Gegensatz zu dem

Adh1-Protein und Gal1 sehr spezifisch an die Affi-Gel-Blue-Matrix. So konnten im Durchlauf die Kontaminationen verworfen werden und 6xHisGal80 durch eine Schlagelution mit 1M NaCl gesammelt werden (Abbildung 3.9 B). Um diese beiden Proteinfractionen ganz sauber zu trennen, wurden die einzelnen Fraktionen nach der Affi-Gel-Blue-Säule auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert (Abbildung 3.9 B). Nach Vereinigung der ausschließlich 6xHisGal80 enthaltenden Fraktionen (10-19) in Kalium-Phosphat-Puffer wurden diese, analog zur Gal1-Aufreinigung, in Tris-Puffer umgepuffert und aufkonzentriert auf eine Konzentration von 10 mg/ml. Die Ausbeuten dieser Aufreinigungen lagen bei etwa 1,5-3 mg Protein pro Präparation.

Die Aufbewahrung des Gal80-Präparats erfolgte analog zum Gal1. So konnte auch diese Proteinfraction einige Tage im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt werden. Die Aufbewahrung von Gal80 in dem Gal1-Aufreinigungspuffer hatte den Vorteil, dass bei einer Kristallisierung von Gal1 und Gal80 im Komplex die selben Ausgangspuffer vorhanden waren. Für die Kristallisierung ist es wichtig, ein homogenes Gemisch an Protein zu haben, welches nur sehr wenig Abbau aufweist. Es war daher sehr von Vorteil, dass Gal80 ein sehr stabiles Protein ist (K. Breunig, pers. Mitteilung).

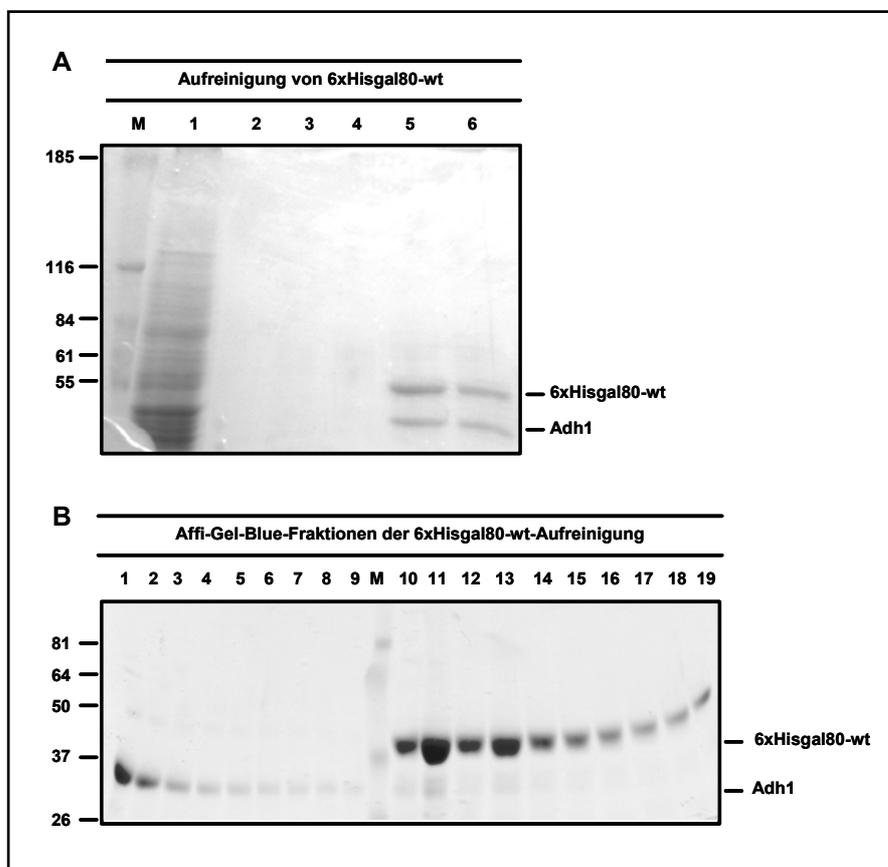


Abbildung 3.9

Dargestellt sind die Aliquots der Peak-Fractionen der Protein-Aufreinigungen von 6xHisGal80-wt aus dem *K. lactis*-Stamm JA6D1R ($\Delta gal1$).

A: Nickel-NTA-Protein-Aufreinigungen des 6xHisGal80-wt. Von den wichtigsten Arbeitsschritten wurden Aliquots entnommen und im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt. Als molekularer Gewichtsmarker wurde der High-molecular Weight Marker (Gibco) verwendet. Spur -1: Rohextrakt; -2-4: Waschfraktionen 1-3; -5: vereinigte Fraktion der ersten Elution mit 300 mM Imidazol; -6: Fraktion nach der Dialyse über Nacht;
B: Affi-Gel-Blue-Protein-Aufreinigungen des 6xHisGal80-wt. Von allen Fraktionen der Affi-Gel-Blue-Aufreinigung wurden Aliquots entnommen, im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. Als molekularer Gewichtsmarker wurde der BenchMark-Prestained Protein Ladder (Invitrogen) verwendet. Spur -1-9: Durchlaufaktionen 1-9; -10-19: Elutionsfraktionen 1-10

3.7.3 Erste Kristalle von Wildtyp Gal1 und Gal1-m1

Durch ein Screening-Verfahren mit dem Hampton Research-Kit 100 Puffer-System (Crystal Screen I und II) konnten erste Kristallisationsbedingungen für die Galaktokinase (Wildtyp Gal1 und Gal1-m1) von J. Labahn in Zusammenarbeit mit R. Engels bestimmt werden. Dazu wurden 10 mg Protein aufkonzentriert und für die Ermittlung der Kristallisationsbedingungen benutzt. Zur langsamen Erhöhung der Protein- und Präzipitans-Konzentrationen wurde die Methode des „hanging-drop“ („hängender Tropfen“) verwendet. Die verwendete Protein-Konzentration betrug 0,7-1,4% (w/v). In vielen Ansätzen konnten zunächst nur ausgefallenes Protein oder klare Tropfen festgestellt werden. Nach zwei Wochen konnte jedoch in dem Ansatz des Crystal Screen I, Puffer 32 (Abschnitt 2.22.1), ein quaderförmiger Kristalle nachgewiesen werden. Der Crystal Screen II, Puffer 24, ergab sternchenförmige Kristalle und der Crystal Screen II, Puffer 46, ergab schneeflockenförmige Kristalle. Im Rahmen dieses Screening-Verfahrens konnte somit u.a. in dem Ansatz mit 2 M Ammoniumsulfat das beste Ergebnis erzielt werden. Daher wurde Ammoniumsulfat als Fällungsmittel unter verschiedenen Bedingungen weiter ausgetestet. Der grösste anschließend ermittelte Kristall des Gal1-Proteins hatte eine Kantenlänge von 0,15 mm, zerfiel jedoch nach Überkristallisation.

Als Additive wurde Magnesium als Co-Faktor in Form von Mg-Sulfat (Endkonzentration 5 mM) und ATP- γ -N (2 mM) verwendet. Dadurch wurde die Hydrolyse des Substrates während der Inkubationszeit, die sich zum Teil über acht Wochen erstreckte, so gering wie möglich gehalten und die ATP-gebundene Form der Galaktokinase stabilisiert. Es konnten in diesem Test verschiedene Formen von Kristallen des Wildtyps Gal1 erzeugt werden (Abbildung 3.10), jedoch waren diese meist zu klein oder instabil. Es konnte aber festgehalten werden, dass die besten Ergebnisse in MES-Puffer (pH 6,7) und 52% Ammoniumsulfat erzielt wurden. Weitere Tests unter diesen Bedingungen erbrachten darüber hinaus Protein-Kristalle der mutierten Gal1-m1-Variante. Zwei dieser Kristalle erreichten eine ausreichende Grösse, um sie erstmalig am Synchrotron in Grenoble vermessen zu können. Sie ergaben zwar nur eine Auflösung von 3Å, aber sie lieferten die ersten Datensätze, die in dieser Arbeit für eine Homologie-Modellierung mit bereits kristallisierten Proteinen der GHMP-Familie verwendet wurden (Abschnitt 3.8.1).

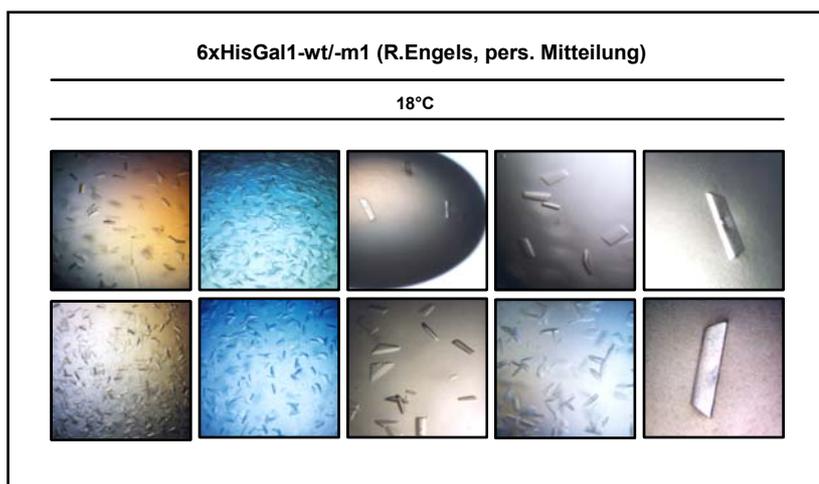


Abbildung 3.10

Gezeigt sind die Aufnahmen von „Hanging-Drop“-Ansätzen mit 6xHisGal1-wt und 6xHisGal1-m1. Die besten Ergebnisse konnten mit einer Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration von 52% bei einem pH 6,7 in 100 mM MES [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid] erzielt werden. Als Additive wurden 10 mM MgSO₄, 5 mM TCEP-HCl [Tris(2-Carboxyethyl)-phosphine hydrochloride], 2 mM ATP- γ -N und 100 mM NaCl verwendet. Die Kristallisationsansätze wurden bei konstanten 18°C inkubiert. Die optimale Protein-Konzentration lag bei 1,5% (w/v)

Im Verlauf dieser Arbeit durchgeführte Kristallisierungsversuche konnten keine weiteren beugungsfähigen Kristalle unter den gefundenen Bedingungen generiert werden. Wir entschieden uns daher nach einem Wechsel der Kooperation von J. Labahn vom IB12 des FZ Jülich zu S. Stork, mittlerweile am Institut für Chemie der FU-Berlin, für ein komplett neues Screening-Verfahren. In diesem Verfahren fanden neben dem Hampton Research-Kit 100 Puffer-System mit dem Crystal Screen I und II auch der Index Screen mit weiteren 96 Kristallisierungs-Puffern Anwendung.

Zudem entschlossen wir uns, parallel auch das Gal80-Protein zu kristallisieren bzw. es im Komplex mit Gal1 in Anwesenheit von ATP und Galaktose zu versuchen. Es gibt Beispiele dafür, dass ein Komplex einfacher kristallisiert werden kann. Dies kann einerseits daran liegen, dass sich die Proteine gegenseitig stabilisieren oder andererseits die Bedingungen für eine Kristallisierung begünstigt werden, weil sich einer der Bindungspartner besser kristallisieren lässt.

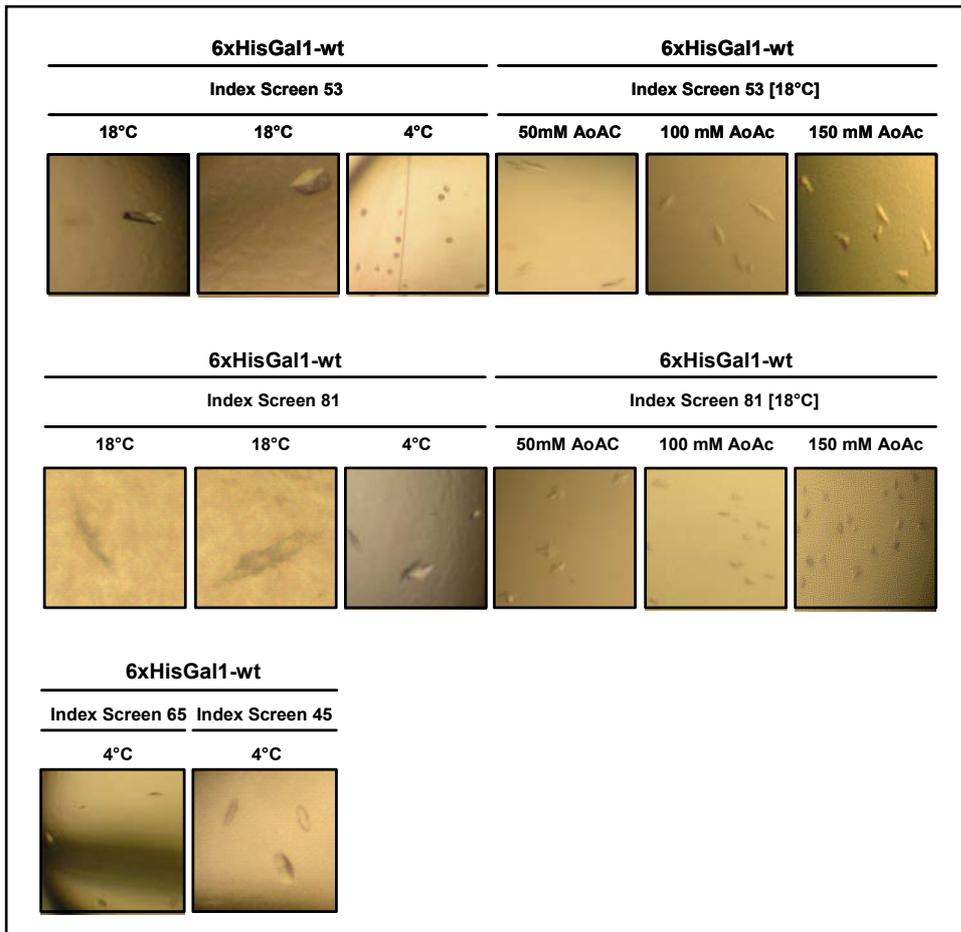
3.7.4 Erneuter Versuch, die Bedingungen der Gal1-Kristallisierung zu optimieren

Mit der Erfahrung in Bezug auf die Schwierigkeit, ausreichend grosse Gal1-Kristalle zu erhalten, die auch noch diffraktieren, wurde in einem neuen Screen-Verfahren neben dem jeweils schon getesteten Crystal-Screen I und Crystal-Screen II auch der Index-Screen mit 96 weiteren Kristallisierungs-Puffern der Fa. Hampton Research getestet. Um das Spektrum der Kristallisierungsbedingungen noch weiter auszudehnen, wurde parallel zu der Standardtemperatur von 18°C auch 4°C getestet. Auch hier wurde das Verfahren des „hanging drop“ (hängender Tropfen) angewandt. Mehrere Versuche mit den Crystal Screens I und II ergaben meist präzipitiertes Protein oder klare Tropfen, in denen nichts passierte. Auch die zuvor gefundenen Bedingungen mit 2 M Ammonium-Sulfat erbrachten kein Resultat. Durch die Hinzugabe von 25% Glycerin im Aufbewahrungspuffer von Gal1 konnte der Zeitraum, in dem das Protein präzipitierte verlängert und somit das Protein ein wenig stabilisiert werden.

Bei Verwendung des Index-Screens wurden unter verschiedenen Bedingungen Kristalle gefunden. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, konnten mit den Index-Screen-Puffern 53 (Abschnitt 2.22.1), 81, 65 und 45 Kristalle erhalten werden. Mit den Puffern 53 und 81 konnte sowohl bei 18°C als auch bei 4°C eine Kristallbildung beobachtet werden; mit den Puffern 65 und 45 lediglich bei 4°C. Weitere sehr kleine Kristalle konnten mit dem Puffer 92 erzielt werden.

Alle Kristalle waren aber ungeeignet für eine Vermessung, da sie zum Teil aus dem Präzipitat wuchsen oder zu klein waren. Bei genauer Betrachtung der Puffer-Zusammensetzungen ist eine Tendenz erkennbar, dass die Kristallbildung von 6xHisGal1 in Tris-Puffer mit Ammoniumacetat und /oder Polyethylenglycol stattfinden kann. Tests unter den Pufferbedingungen einiger bereits kristallisierter Proteine der GHMP-Familie erbrachten lediglich Protein-Präzipitate.

Die Screen-Verfahren von Gal1 sind noch nicht abgeschlossen. In den bereits erfolgreichen Puffern (53 und 81) werden die Konzentrationen des MPD (36, 39, 42, 45, 48, 51 %); des PEG 3350 (19, 21, 23, 25, 27, 29 %), die pH-Werte des TRIS-Puffers (8.0, 8.5, 9.0) und die Temperatur (4°C, 18°C und 25°C) weiter optimiert.

**Abbildung 3.11**

Gezeigt sind die Aufnahmen von „Hanging-Drop“-Ansätzen mit 6xHisGal1-wt. Die besten Ergebnisse konnten mit den Index-Screen-Puffern 53, 81, 65 und 45 bei 18°C bzw. 4°C erzielt werden. Allen Puffern wurde 2 mM AMPNPP und 2 mM Galaktose hinzugegeben. Die Proteinkonzentration lag bei 1,0% (w/v).

3.7.5 Kristallisierung von Gal1 und Gal80 im Komplex

Die Kristallisierung von Gal1 scheint auch nach dem neuen Puffer-Screen relativ schwierig zu sein. Viele Proben sind direkt ausgefallen oder reagierten etwas verzögert nach Zugabe von Glycerin. Wir entschieden uns daher, zwar die gefundenen Bedingungen weiter zu optimieren, jedoch auch damit zu beginnen, den Komplex aus Gal1 und Gal80 zu kristallisieren. Aus persönlicher Mitteilung von K. Breunig war bekannt, dass die Kristallisierung von Gal80 alleine sich auch schwierig gestaltet. Zum einen sind die Ausbeuten an Protein sehr gering und zum anderen findet man so gut wie keine Bedingungen, unter denen das Protein zum Kristallisieren gebracht werden kann. Versuche mit den zuvor genannten Crystal-Screen I, Crystal-Screen II und Index-Screen-Puffern führten auch bei uns zu keinem Resultat.

In Gegenwart von 2 mM Galaktose und 2 mM AMPNPP versuchten wir nun in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1, die Proteine 6xHisGal1 und 6xHisGal80, miteinander im Komplex zu kristallisieren. Mit Hilfe von Crystal-Screen I und II wurden die ersten Tropfen im „hanging drop“-Verfahren aufgesetzt. Die Proteinkonzentration beider Proteine lag bei jeweils 1%. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, gibt es vier Puffer-Bedingungen, bei denen zum Teil aus dem Präzipitat Kristalle gewachsen sind. Puffer 6 des Crystal-Screen I und Puffer 39, Puffer 46 und Puffer 47 des Crystal Screen II bei 18°C. Die gleichen Tests wurden nachfolgend auch bei 4°C

gemacht und erbrachten das gleiche Ergebnis. Bislang führten die Versuche zur Optimierung der gefundenen Bedingungen lediglich zu transienten Kristallen.

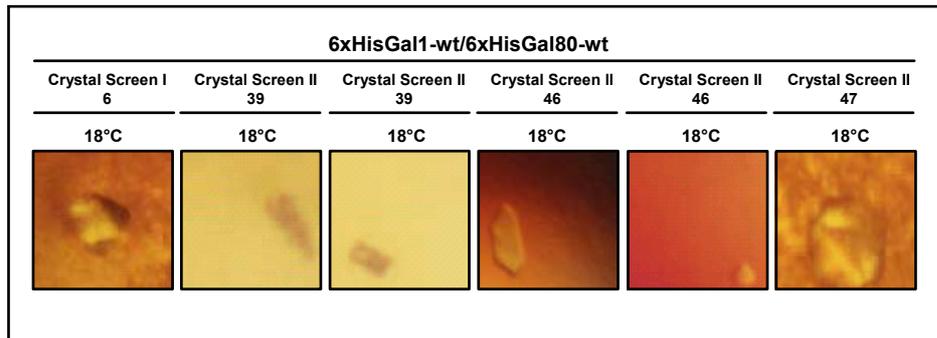


Abbildung 3.12

Gezeigt sind die Aufnahmen von „Hanging-Drop“-Ansätzen mit 6xHisGal1-wt im Komplex mit 6xHisGal80-wt. Die besten Ergebnisse konnten mit dem Crystal-Screen I, Puffer 6 und den Crystal-Screen II, Puffern 39, 46 und 47 bei 18°C bzw. 4°C erzielt werden. Allen Puffern wurde 2 mM AMPNPP und 2 mM Galaktose hinzugegeben. Die Protein-Konzentrationen lagen bei 1,0% (w/v).

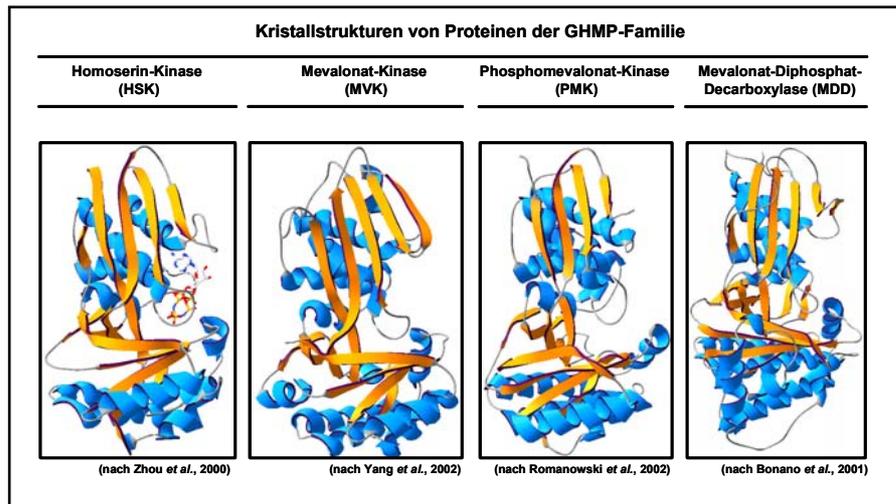
3.8 Strukturmodelle der Galaktokinase und Gal80 durch Homologie-Vergleiche

Die Galaktokinase kann in eine mittlerweile grosse Familie der GHMP-Kinase eingeordnet werden (Bork *et al.*, 1993). Zu dieser Familie gehören auch, die Homoserin-Kinasen, die Mevalonat-Kinasen und die Phosphomevalonat-Kinasen. Die Galaktokinase ausgenommen, liegen von allen Vertretern Kristallstrukturen vor (Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001; Bonanno *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002 und Romanowski *et al.*, 2002). Diese Strukturen bildeten die Grundlage für ein Homologie-Modelling unter Hinzunahme der Datensätze der 6xHisGal1-m1 Kristalle.

Die Suche nach homologen Proteinen von Gal80 aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* war nur erfolgreich in einer Proteinstruktur-Datenbank (MODBASE®: <http://alto.rockefeller.edu/modbase-cgi/index.cgi>) und zeigte die Glukose-Fruktose-Oxidoreductase aus *Zymomonas mobilis* mit der höchsten zu ermittelnden Strukturhomologie (Score:1,0). Aufgrund der fehlenden Datensätze von Gal80 ist mit dieser Struktur zwar noch kein verlässliches Homologie-Modelling möglich, aber sie kann für die Erstellung eines möglich Interaktionsmodells hilfreich sein.

3.8.1 Homologie-Modelling der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*

Die Galaktokinase Gal1 kann der Familie der GHMP-Proteine zugeordnet werden (Bork *et al.*, 1993). Mitglieder dieser Familie sind die Galaktokinasen, die Homoserin-Kinasen, die Mevalonat-Kinasen und die Phosphomevalonat-Kinasen. Wie schon in Abschnitt 1.6 beschrieben, werden diese Kinasen aufgrund des P-Loops in einer Gruppe zusammengefasst. Der P-Loop ist eine von drei stark konservierten Bereichen innerhalb dieser Gruppe, der das Co-Substrat ATP bindet. Die Homologie dieser Proteine ist mit durchschnittlich 20% Identität relativ gering (Abbildung 3.14). Jedoch zeigen kürzlich gelöste Strukturen der Proteine *M. jannaschii* Homoserin-Kinase (HSK: 1FWK, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001), *M. jannaschii* Mevalonat-Kinase (MVK: 1KKH, Yang *et al.*, 2002), *S. pneumoniae* Phospho-Mevalonat-Kinase (PMK: 1K47, Romanowski *et al.*, 2002) und *S. cerevisiae* Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase (MDD: 1F14, Bonanno *et al.*, 2001), dass diese Familie topologisch stark konserviert ist (Abbildung 3.13).

**Abbildung 3.13**

Kristallstrukturen der GHMP-Proteine *M. jannaschii* Homoserin-Kinase (HSK: 1FWK, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001), *M. jannaschii* Mevalonat-Kinase (MVK: 1KKH, Yang *et al.*, 2002), *S. pneumoniae* Phospho-Mevalonat-Kinase (PMK: 1K47, Romanowski *et al.*, 2002) und *S. cerevisiae* Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase (MDD: 1FI4, Bonano *et al.*, 2001)

In der Protein Daten Bank RSCB (Berman *et al.*, 2000) konnten die Struktur-Daten der verschiedenen GHMP-Proteine heruntergeladen werden und mit Hilfe des pdb-Viewers (Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997) dargestellt werden (Abbildung 3.13).

Aufgrund der offensichtlich starken strukturellen Übereinstimmungen dieser Proteine zogen wir in Erwägung, dass die Galaktokinase Gal1 eine vergleichbare Struktur haben müsste. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, müsste mindestens eine dieser Kristallstrukturen in den Daten Banken gefunden werden, die eine solche Homologie aufweisen kann. Mit dem Programm MODBASE[®] (Pieper *et al.*, 2002) können annotierte Proteinstrukturen in verschiedenen Datenbanken mit Proteinsequenzen verglichen werden. Aufgrund von Homologien die gefunden werden, kann dieses Programm mit MODPIPE[®], einer automatischem Modelling-Funktion, basierend auf den Programmen PSI-Blast[®] und Modeller[®], vertrauenswürdige Strukturmodelle vorhersagen. Der Grad der Homologie wird mittels eines Scores (Korrelation) und einem e-Value angegeben. Der Score befindet sich zwischen 0 und 1. Je mehr sich der Wert der 1 nähert desto grösser ist die Homologie innerhalb der gefundenen Strukturen. Umgekehrt verhält es sich mit dem e-Value. Je kleiner der e-Value desto grösser ist die Homologie. Mit den Sequenzen von Gal1 aus *K. lactis* und Gal1 und Gal3 aus *S. cerevisiae* wurde ein solcher Vergleich gemacht.

Mit einem Score von 0,47 und einem e-Value von $4e-36$ für alle drei Protein-Sequenzen konnte eine mittlere Homologie mit der Homoserin-Kinase (HSK) aus *M. jannaschii* gefunden werden. Somit liegt nahe, dass auch Gal1 eine vergleichbare Struktur hat. Leider wurden die anderen drei kristallisierten Proteine von dieser Datenbank nicht berücksichtigt. Es ist aber anzunehmen, dass die Resultate in etwa denen der HSK entsprochen hätten. Unterstützt werden kann dies durch ein Protein-Alignment (Abbildung 3.14). Demnach ist Gal1 zu 20% identisch mit der HSK und der MDD, zu 12% mit der PMK und zu 30% mit der MVK.

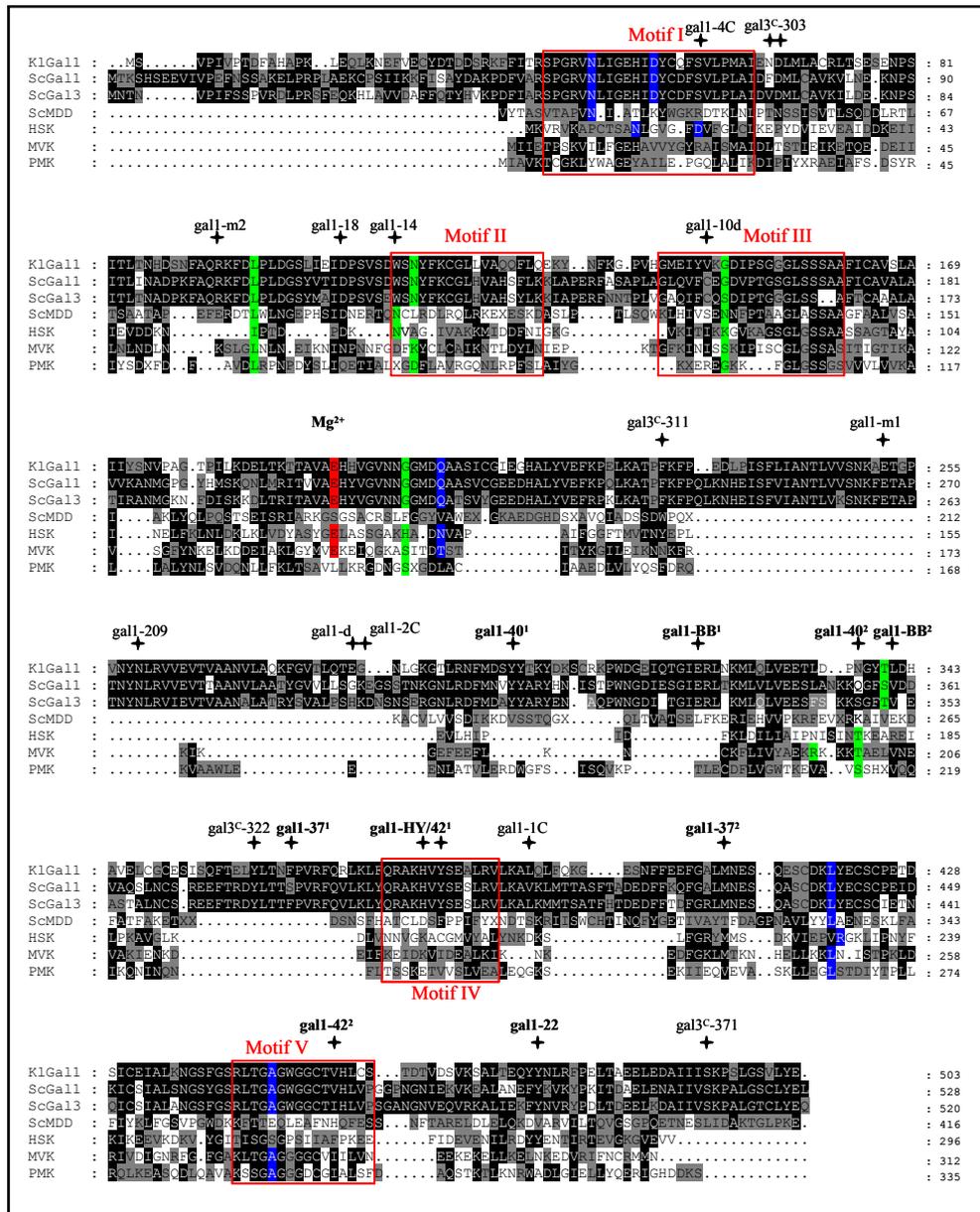


Abbildung 3.14

Proteinsequenzvergleich zwischen der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*, der Galaktokinase aus *S. cerevisiae*, Gal3 aus *S. cerevisiae*, Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase (MDD: 1FI4, Bonanno *et al.*, 2001) aus *S. cerevisiae*, Homoserin-Kinase (HSK: 1FWK, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001) aus *Methanococcus jannaschii*, Mevalonat-Kinase (MVK: 1K1H, Yang *et al.*, 2002) aus *Methanococcus jannaschii* und Phosphoserinat-Kinase (PMK: 1K47, Romanowski *et al.*, 2002) aus *Streptococcus pneumoniae*. Die roten Umrahmungen veranschaulichen die fünf konservierten Bereiche der Galaktokinase (Motiv I-V) und die drei der GHMP-Kinasen (Motiv I, III und V). Desweiteren sind die bekannten GAL1-Mutanten (Vollenbroich *et al.*, 1999; Menezes, persönliche Mitteilung) und die GAL3-Mutanten (Blank *et al.*, 1997) eingetragen. Mit Blau sind mögliche Substrat-Bindestellen und mit Rot die Magnesium-Bindestelle. Das Alignment wurden mit dem Programm ClustalX gemacht.

Das Alignment zeigt, dass aufgrund der Identität, auch die Proteine MVK und MDD topologisch mit Gal1 vergleichbar sein können. Mit der Sekundärstruktur dieser Proteine, im Vergleich mit einer Struktur-Vorhersage von Gal1, sollte weiter die topologische Vergleichbarkeit gezeigt werden. Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Gal1 wurde mit dem Programm NPS@ (Network Protein Sequence Analysis: Combet *et al.*, 2000) erstellt.

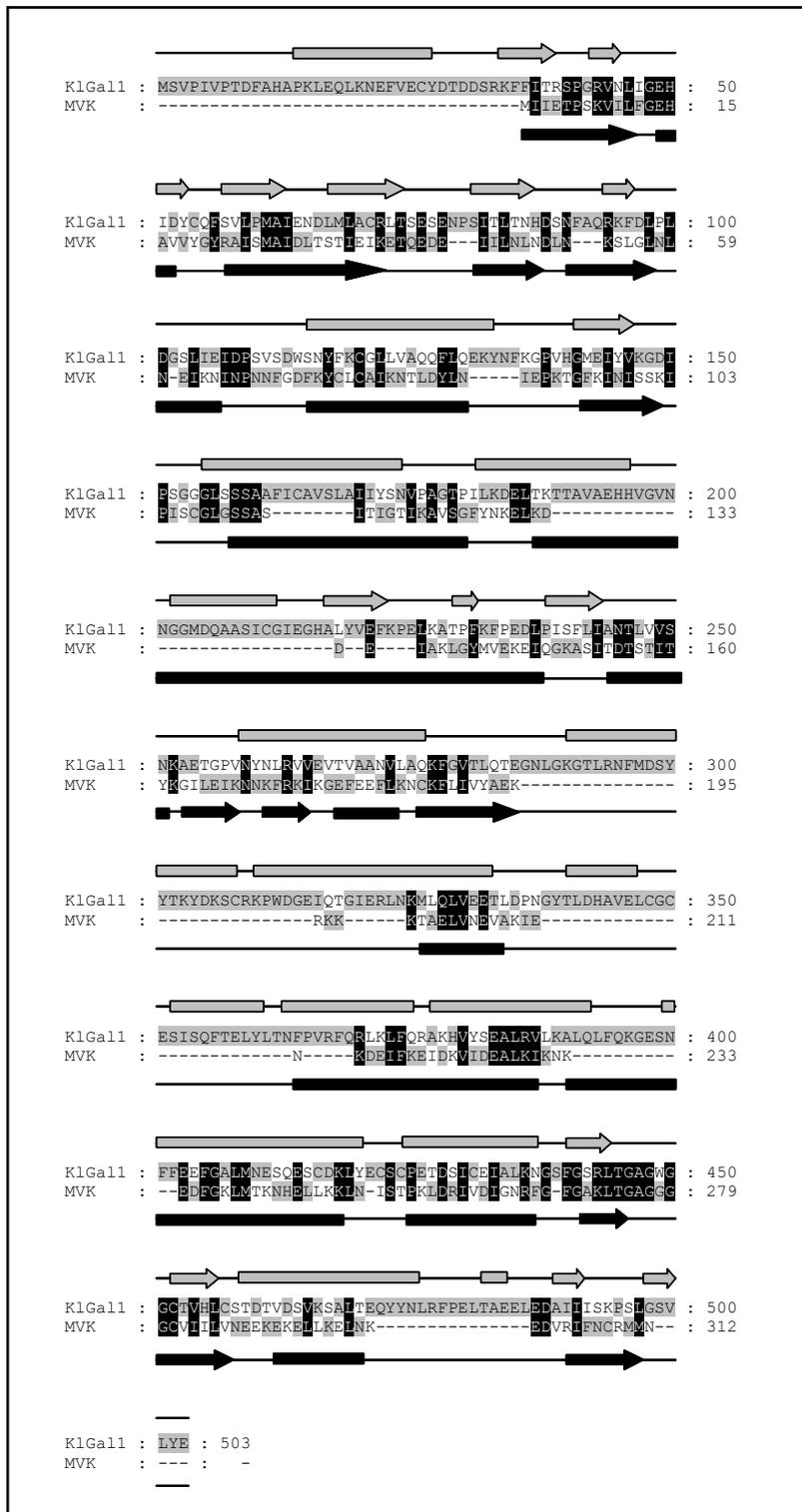


Abbildung 3.15

Vergleich der Sekundärstruktur zwischen der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis* und der Mevalonat-Kinase MVK (1KKH, Yang *et al.*, 2002) aus *Methanococcus jannaschii*. Die Sekundärstruktur Vorhersage für Gal1 wurde mit dem Programm NPS@ (Network Protein Sequence Analysis: Combet *et al.*, 2000) erstellt. Mit den gefüllten Rechtecken, sind die α-Helices dargestellt, mit den gefüllten Pfeilen die β-Faltblätter und mit der einfachen Linie die unstrukturierten Bereiche. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt.

In Abbildung 3.15 wird zunächst der Vergleich der Sekundärstrukturen der MVK und der von Gal1 aus *K. lactis* gezeigt. Die Sekundärstruktur der Galaktokinase ist hellgrau dargestellt und die der Mevalonat-Kinase in Schwarz. Es ist erkennbar, dass über weite Strecken die Sekundärstrukturen beider Proteine vergleichbar ist. Es gibt lediglich im

Bereich der Aminosäuren 200-300 des Proteins Gal1 eindeutige Unterschiede. In dieser Region sind bei Gal1 hauptsächlich α -Helices (gefüllte Rechtecke) erkennbar, wohingegen bei der MVK β -Faltblätter (gefüllte Pfeile) bzw. unstrukturierte Bereiche (einfache Linie) zu sehen sind. Der Vergleich der Sekundärstrukturen zwischen den Proteinen MDD und Gal1 (Abbildung 3.16) unterstrich die Annahme, dass die Topologie von Gal1 denen der GHMP's tatsächlich ähnlich sein muss. Die Sekundärstruktur ist bis auf einen kleinen Bereich zwischen den Aminosäuren 363 und 392 fast identisch.

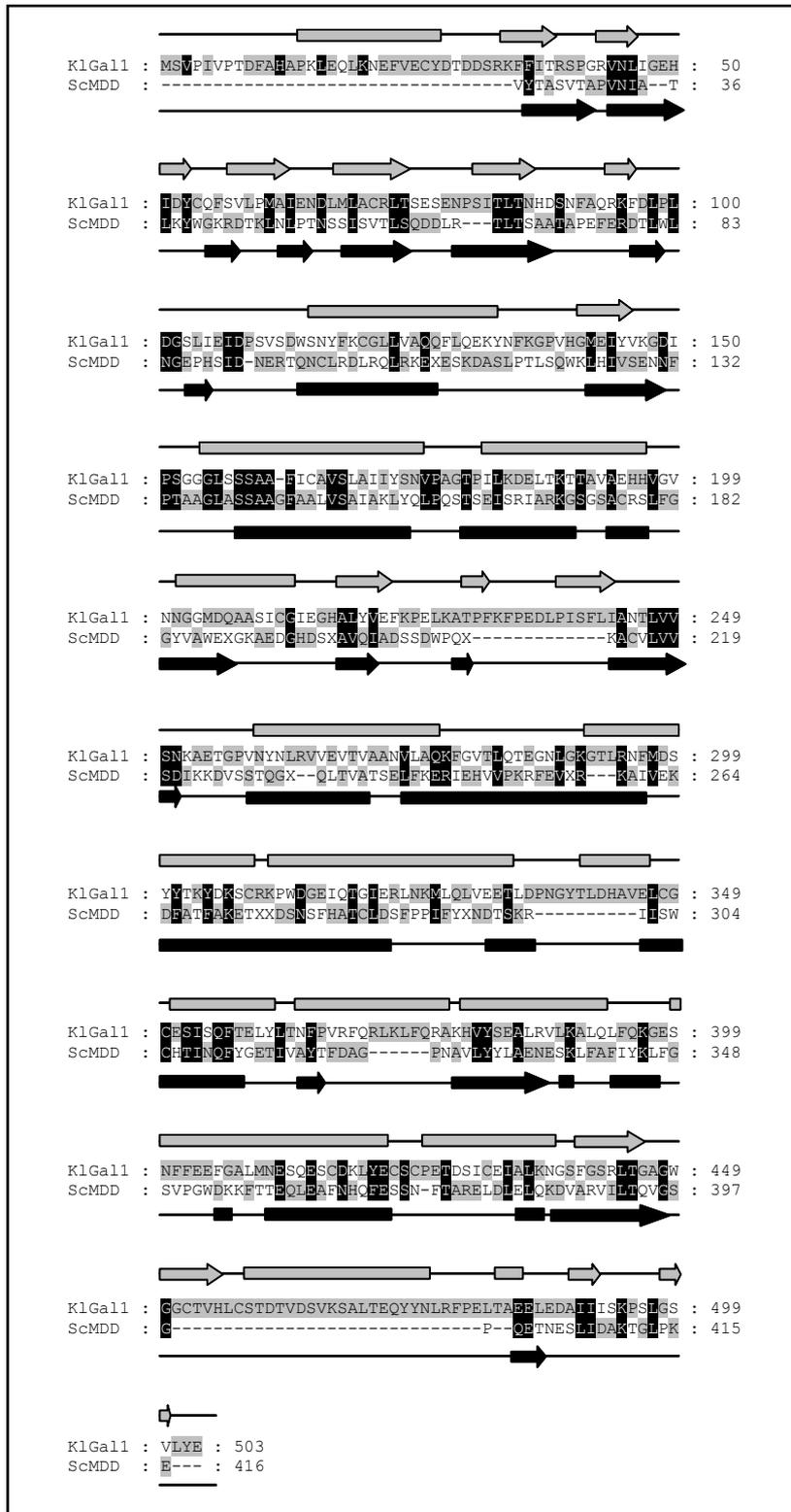


Abbildung 3.16

Vergleich der Sekundärstruktur zwischen der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis* und der Mevalonat-Kinase Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase MDD (1F14, Bonano *et al.*, 2001) aus *S. cerevisiae*. Die Sekundärstruktur Vorhersage für Gal1 wurde mit dem Programm NPS@ (Network Protein Sequence Analysis: Combet *et al.*, 2000) erstellt. Mit den gefüllten Rechtecken, sind die α -Helices dargestellt, mit den gefüllten Pfeilen die β -Faltblätter und mit der einfachen Linie die unstrukturierten Bereiche. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt.

Die bisher gezeigten Strukturanalysen mit MODBASE[®] (Homologie-Modelling), ClustalX (Protein-Alignment nach Thompson *et al.*, 1997) und NPS@ (Vergleich der Sekundärstrukturen) verdeutlichten, dass die 3D-Struktur von Gal1 denen der GHMP's sehr ähnlich sein müssen. Wir entschieden uns daher, in Kooperation mit J. Labahn ein Homologie-Modelling, basierend auf „3D jigsaw Comparative Modelling Server“, und dem „Swiss Modelling Server (ProDomII)“ mit den Datensätzen der Gal1-Kristalle durchzuführen (J.Labahn, pers. Mitteilung). Dabei war das automatische Modelling der N-terminalen Domäne (AS 41-228) erfolgreich. Ein automatisches Modelling mit dem Rest des Proteins konnte aber aufgrund zu geringer lokaler Homologie zunächst nicht durchgeführt werden. Erst mit Hilfe der MVK konnte dann eine Struktur für die Aminosäuren 229-248 und 336-503 identifiziert werden. Der fehlende Bereich der Aminosäuren 248-335 konnte mit der MVK nicht erfasst werden. Durch den Vergleich der Sekundärstrukturen ist jedoch ersichtlich, dass diese Region mit der der MDD vergleichbar ist (Abbildung 3.16) und somit hauptsächlich helikale Strukturen aufweist. Das ermittelte Homologie-Modell für Gal1 beinhaltete 374 von 503 Aminosäuren. Diese wurden für eine Positionierung mit empr (C.R. Kissinger, D.K. Gehlhaar and B.A. Smith, Agouron Pharmaceuticals, Inc) für einen evolutionären Suchalgorithmus durch die Wegnahme der unstrukturierten Bereiche (Loops) auf 301 Aminosäuren reduziert. Durch Hinzunahme des Datensatzes der bereits vermessenen Kristalle von Gal1 mit einer Auflösung von 3Å konnte ein Modell mit einem Korrelationsfaktor von 0,46 bestimmt werden (Abbildung 3.17).

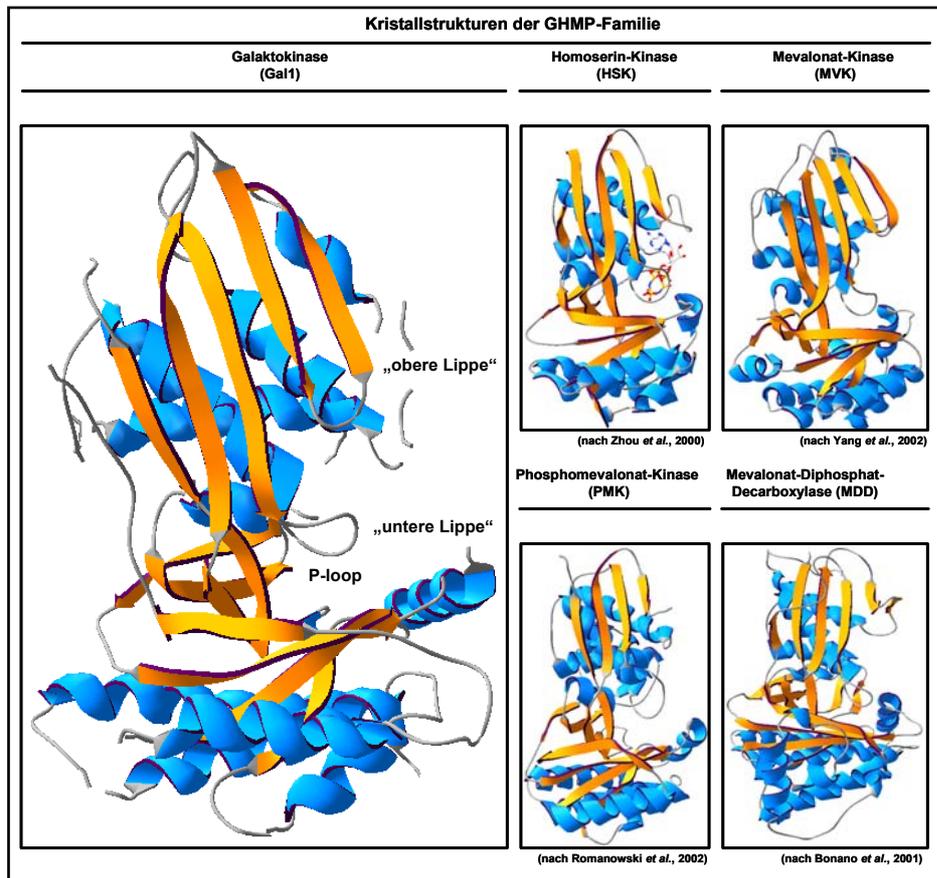


Abbildung 3.17

Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis* im Vergleich zur Homoserin-Kinase (HSK: 1FWK, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001) aus *Methanococcus jannaschii*, Mevalonat-Kinase (MVK: 1KKH, Yang *et al.*, 2002) aus *Methanococcus jannaschii*, Phospho-Mevalonat-Kinase (PMK: 1K47, Romanowski *et al.*, 2002) aus *Streptococcus pneumoniae* und Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase (MDD: 1F14, Bonano *et al.*, 2001) aus *S. cerevisiae*.

Die modellierte Proteinstruktur weist nach Betrachtung der Oberfläche, wie bereits für die GHMP-Proteine beschrieben, eine grosse tiefe Kluft zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus auf. Diese Kluft wird wie in der HSK gezeigt (Krishna *et al.*, 2001), durch eine flexible obere Lippe und untere Lippe gebildet, welche das gebundene Substrat umschliessen können. Dieses Merkmal ist bei allen GHMP-Strukturen wiederzufinden, sie wird hauptsächlich durch zwei konservierte Bereiche (Motiv I und III) gebildet. Das Motiv III ist Teil des „Phosphate-binding-Loop“ (P-loop), der wie erwähnt ein typisches Merkmal der GHMP-Proteine ist. Die Position des P-loop in der tiefen Kluft ist in allen GHMP-Proteinstrukturen nahezu identisch (Abbildung 3.18)

Der klassische P-loop hat die Konsensussequenz PXaa₃GLXSSAA und bildet ein β -Faltblatt und eine α -Helix, die über einen unstrukturierten Loop miteinander verbunden sind (Abbildung 3.18, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001; Bonanno *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Romanowski *et al.*, 2002). Dieser P-loop wird durch das α - und β -Phosphat des ATP gebunden und ermöglicht den Transfer des γ -Phosphats durch einen nucleophilen Angriff auf das Substrat, welches an der Substratbindestellen in der tiefen Kluft gebunden wird (Zhou *et al.*, 2000).

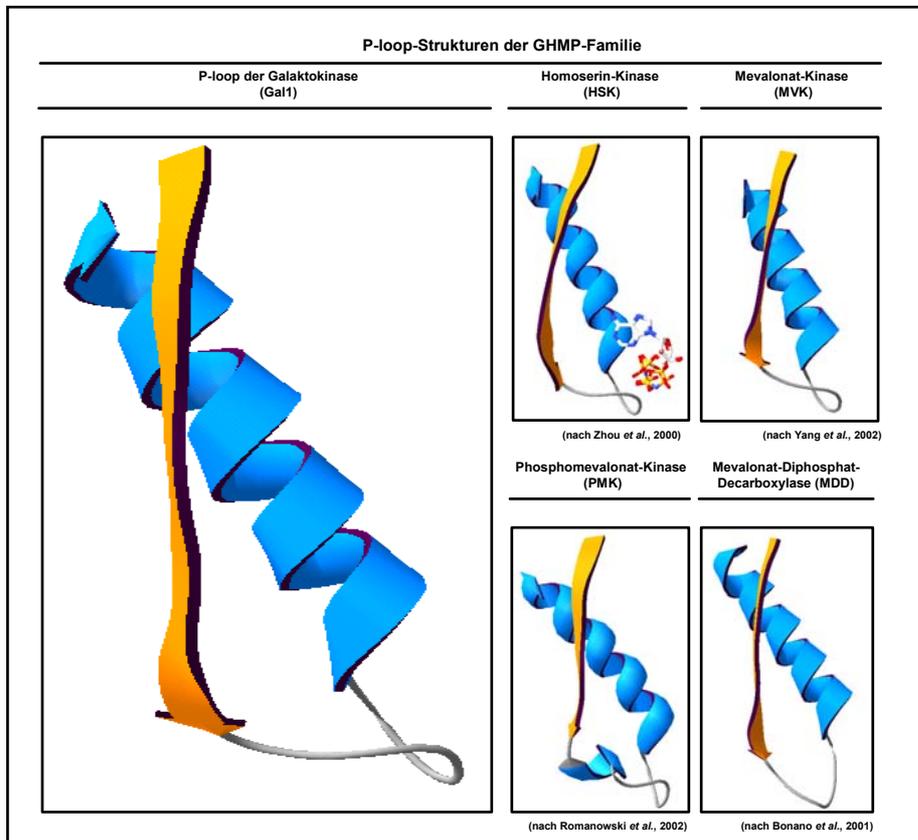


Abbildung 3.18

P-loop-Strukturen der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis* im Vergleich zur Homoserin-Kinase mit gebundenem ATP (HSK: 1FWK, Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001) aus *Methanococcus jannaschii*, Mevalonat-Kinase (MVK: 1KKH, Yang *et al.*, 2002) aus *Methanococcus jannaschii*, Phospho-Mevalonat-Kinase (PMK: 1K47, Romanowski *et al.*, 2002) aus *Streptococcus pneumoniae* und Mevalonat-Diphospho-Decarboxylase (MDD: 1FI4, Bonano *et al.*, 2001) aus *S. cerevisiae*.

Im Detail sieht man in der vorliegenden Struktur von Gal1 (Abbildung 3.17) eine grosse N-terminale Domäne mit einem Mix aus fünf β -Faltblättern und eine kleinere N-terminale Domäne mit vier antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, flankiert von vier langen α -Helices. Diese Domäne ist in allen Strukturen der GHMP-Proteine ähnlich aufgebaut. Die C-terminale Domäne hat eine Core-Einheit, die durch eine Art $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltung übernommen wird. Sie wird gebildet durch vier antiparallele β -Faltblätter, eingepackt in zwei α -Helices, und weiteren drei β -Faltblättern, die in diese Region ragen. Umschlossen wird diese Region durch einen Bereich, der teilweise in der modellierten Struktur fehlt (Aminosäuren 290-370). In der Strukturvorhersage mit dem Programm NPS@ konnten vier α -Helices ausgemacht werden. Diese scheinen aber falsch zu sein, da sich in der Region der letzten beiden α -Helices (Aminosäuren 356-368) 4 Aromaten jeweils im Abstand von 4 Aminosäuren ergeben haben (F₃₅₆XXX_Y₃₆₀XXX_F₃₆₄XXX_F₃₆₈), die eine solche Anordnung der Struktur motive nicht zulassen (J. Labahn, pers. Mitteilung). Folgende Struktur motive konnten für diesen Bereich abgeleitet werden: In dem Bereich der Aminosäuren 290-300 konnte wie auch mit NPS@ eine α -Helix vorhergesagt werden. Zwischen den Aminosäuren 301-310 konnte ein loop identifiziert werden, zwischen 311-334 eine α -Helix und abweichend von der NPS@-Vorhersage zwischen den Aminosäuren 339-348 ein β -Faltblatt und in dem Bereich zwischen 364-370 ein weiteres β -Faltblatt. Diese Anordnung ist nahezu identisch mit jener in der Struktur der MDD (Abbildung 3.18). Dieses Motiv umschließt in der Ansicht der Abbildung 3.19 den hinteren Teil der Kluft und kommt quer durch die Kluft unterhalb des P-loops wieder nach vorne zur unteren Lippe, wobei die β -Faltblätter direkt unterhalb der postulierten Zuckerbindestelle liegen (Motiv I). In

diesem Modell der Galaktokinase können jetzt alle bisher generierten Mutanten der Gene *GAL1* und *GAL3* in einer 3D-Struktur kartiert und analysiert werden.

3.8.2 Kartierung der *gal1*- und *gal3*-Mutanten in das Homologie-Modell von GalI aus *K. lactis*

Bisher konnten die relativen Positionen der Mutationen von *gal1* und auch *gal3* nur anhand eines Protein-Alignments gezeigt werden (Abbildung 3.14). Dies führte zu den Rückschlüssen, dass aufgrund der teilweise weit auseinander liegenden Mutationen in der Proteinsequenz, die Regionen, die an der Interaktion mit Gal80 beteiligt sind, durch die Faltung des GalI-Proteins zusammenkommen und eine Interaktionsdomäne formen. Eine Kartierung der *gal1*-Mutanten aus *K. lactis* und *gal3*-Mutanten aus *S. cerevisiae* in dem nun vorliegenden Modell der GalI-Struktur ermöglicht erstmalig die genaue Lokalisierung beteiligter Proteinregionen an der Interaktion mit Gal80. In Tabelle 3.11 sind die Mutanten von *GAL1* und *GAL3* zusammengefasst.

Mutierte <i>GAL1</i> - und <i>GAL3</i> -Allele		
<i>GAL1</i> -Allele	AS-Austausche	Referenz
<u>reg⁻ kin⁺ Mutanten</u>		
<i>gal1-22</i>	Y474C	diese Arbeit
<i>gal1-40</i>	Y300H; N337S	diese Arbeit
<i>gal1-37</i>	F368S, M409S	diese Arbeit
<i>gal1-42</i>	H379R, V454L	diese Arbeit
<i>gal1-m1</i>	E254C	Vollenbroich <i>et al.</i> 1999
<i>gal1-m2</i>	R94C	Vollenbroich <i>et al.</i> 1999
<i>gal1-14</i>	W114R	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gal1-18</i>	D108A	Menezes, pers. Mitteilung
<u>reg⁻ kin⁻ Mutanten</u>		
<i>gal1-HY</i>	H379R, Y381N	diese Arbeit
<i>gal1-10d</i>	V146F	Vollenbroich <i>et al.</i> 1999
<u>reg⁺ kin⁻ Mutanten</u>		
<i>gal1-209</i>	N261Y	Vollenbroich <i>et al.</i> 1999
<u>konstitutive Mutanten</u>		
<i>gal1-BB</i>	E321G, L341P	diese Arbeit
<i>gal1-1C</i>	L391F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gal1-2C</i>	G286F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gal1-4C</i>	S57F	Menezes, pers. Mitteilung
<i>gal1-d</i>	E285K	Vollenbroich <i>et al.</i> 1999
<i>gal3^c-303</i>	V69E, D70V	Blank <i>et al.</i> 1997
<i>gal3^c-311</i>	F237Y	Blank <i>et al.</i> 1997
<i>gal3^c-322</i>	D368S	Blank <i>et al.</i> 1997
<i>gal3^c-371</i>	S509P/L	Blank <i>et al.</i> 1997

Tabelle 3.11

Auflistung aller bisher identifizierten *gal1*-Mutanten aus *K. lactis* und *gal3*-Mutanten aus *S. cerevisiae*. Die mutierten *GAL1*- und *GAL3*-Allele sind in vier Gruppen unterteilt. Gruppe I: regulatorisch defekt, Kinase aktiv; Gruppe II: regulatorisch defekt, Kinase inaktiv; Gruppe III: regulatorisch intakt, Kinase inaktiv und Gruppe IV: konstitutiv. Die Aminosäure(AS)-Austausche sind angezeigt.

Die Mutanten sind in vier Gruppen unterteilt. Gruppe I: regulatorisch defekt, Kinase aktiv; Gruppe II: regulatorisch defekt, Kinase inaktiv; Gruppe III: regulatorisch intakt, Kinase inaktiv und Gruppe IV: konstitutiv. Mit Hilfe des pdb-Viewers (Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997) kann die modellierte Struktur von GalI dargestellt und jede einzelne Aminosäure hervorgehoben werden. Es ist daher möglich, jede Position des Moleküls zu zeigen, an der ein Aminosäure-Austausch eine phänotypische Veränderung hervorgerufen hat. Die Mutationen einer jeden Gruppe wurden aufgrund der besseren Übersicht separat in dem Modell dargestellt. Die Lokalisierung der *gal1* und *gal3*-Mutanten in der modellierten GalI-Struktur haben zu interessanten Resultaten geführt.

Bestimmte Veränderungen des Phänotyps können mit bestimmten Bereichen des Proteins assoziiert werden.

In Abbildung 3.19 sind die Mutationen der Gruppe I dargestellt. Diese Mutanten sind in verschiedenen Regionen des Moleküls lokalisiert, gelangen aber durch die Faltung des Proteins in räumlich Nähe. So sind die Mutanten *gall-14*, *gall-18* und *gall-m2* an der Oberfläche der oberen Lippe und die Mutanten *gall-m1* und *gall-22* in der unteren Lippe lokalisiert.

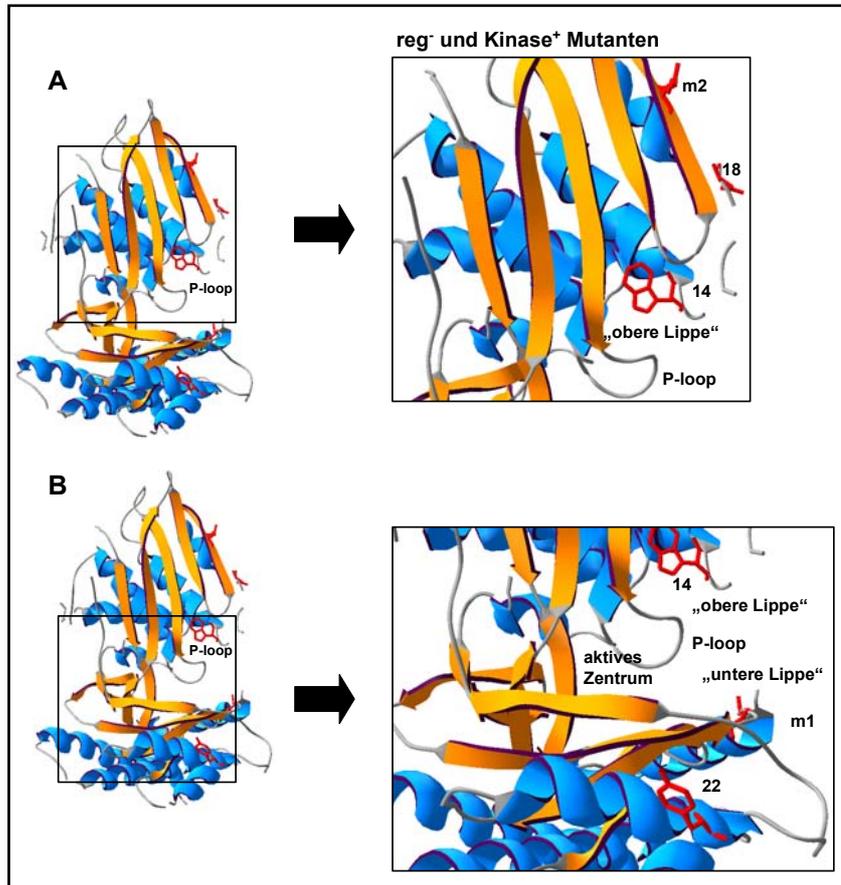


Abbildung 3.19

Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*. Dargestellt sind die regulatorisch defekten, aber Kinase-aktiven Mutanten. A: Die Mutationen in der oberen Lippe im N-terminalen Bereich. B: Die Mutationen in der Nähe der unteren Lippe im C-terminalen Bereich.

Die Mutante *gall-40*, die in dieser Abbildung nicht dargestellt ist, befindet sich in dem Bereich des Moleküls, welcher nicht modelliert werden konnte (Aminosäuren 290-370). Strukturelle Vergleiche mit der MDD zeigten, dass die Mutation (N337S) von *gall-40* wie die Mutation der *gall-m1* und *gall-22* in der unteren Lippe nahe der Oberfläche des Proteins zu finden ist. Es kann damit festgehalten werden, dass die Mutanten mit einem Defekt in der Interaktion mit Gal80, die aber noch eine Galaktokinase-Funktion haben, auf einer Seite der Gal1-Struktur lokalisiert sind. Sie befinden sich an der Oberfläche oberhalb und unterhalb der Kluft und können durch eine Konformationsänderung, die für die HSK bereits gezeigt werden konnte (Zhou *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 20001), nach Bindung der Substrate in der tiefen Kluft näher zusammen kommen und so eine mögliche Interaktionsfläche mit Gal80 bilden. Die Austausch dieser Mutanten führen in allen Fällen zu veränderten Interaktionen mit dem Protein Gal80, die möglicherweise über diesem Bereich stattfinden und so verhindert werden.

Die Mutationen der zweiten Gruppe (regulatorisch defekt und Kinase inaktiv) weisen ebenfalls eine bestimmte Lokalisation auf. Anders als die Mutationen, die lediglich einen Defekt in der Interaktion mit Gal80 haben und an der Oberfläche liegen, sind die Mutanten der zweiten Gruppe hauptsächlich im Inneren der C-terminalen Region lokalisiert. Einzig die Mutation des Allels *gall-10d* ist im Bereich der Zuckerbinde-Region wiederzufinden (Abbildung 3.23). Diese Mutation scheint, durch den Austausch bedingt, eine strukturelle Veränderung im oberen Bereich der Zuckerbinde-Region und der α -Helix des P-loops zu bewirken woraus eine komplette Inaktivierung resultiert. Die andere Mutante dieser Gruppe, *gall-HY*, ist wie die Mutanten *gall-37* und *gall-42*

(Abbildung 3.20 A und B) in einer Region des C-Terminus lokalisiert, in der drei β -Faltblätter von je zwei α -Helices flankiert werden. Dieses Motiv bildet eine Art „Fuß“ und scheint für die Integrität der Struktur erheblich zu sein. Die Mutationen der Allele *gal1-HY* und *gal1-42* (H379R) sind in einer α -Helix lokalisiert, die querverlaufend unterhalb der unteren Lippe liegt (Abbildung 3.20 B). In den β -Faltblättern, die in direkter Nachbarschaft zu den erwähnten α -Helices sind, kann man die Mutanten *gal1-37* (M409S) und *gal1-42* (V454L) wiederfinden. Diese Art von Mutationen sind wahrscheinlich nicht direkt an einer Interaktion mit Gal80 oder der Umsetzung von Galaktose beteiligt. Sie scheinen eher die Faltung des Proteins zu beeinflussen.

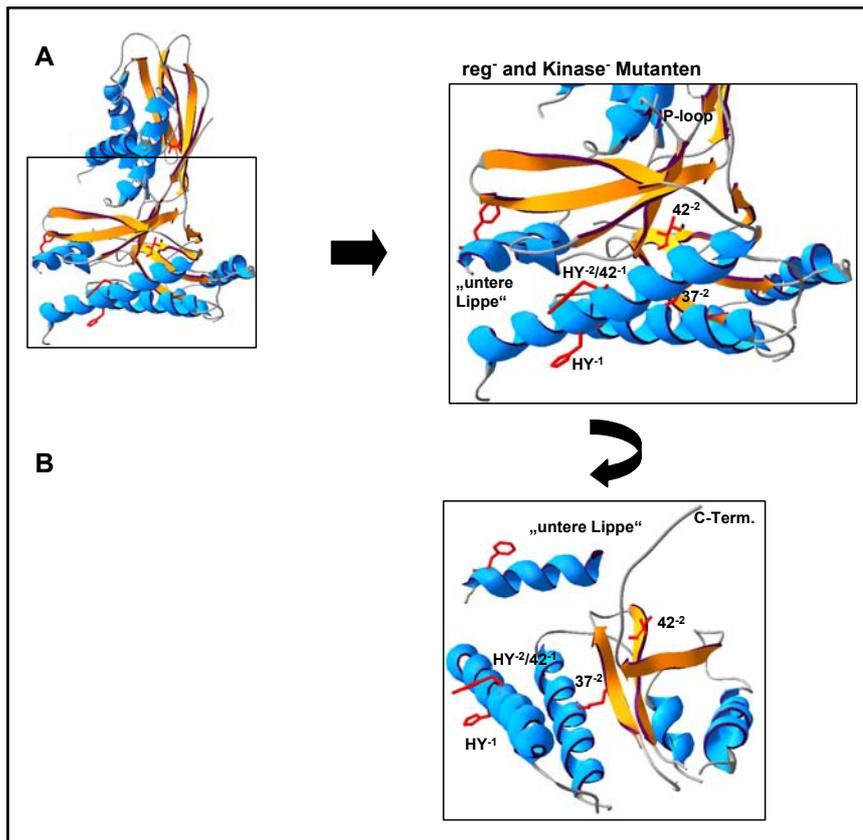


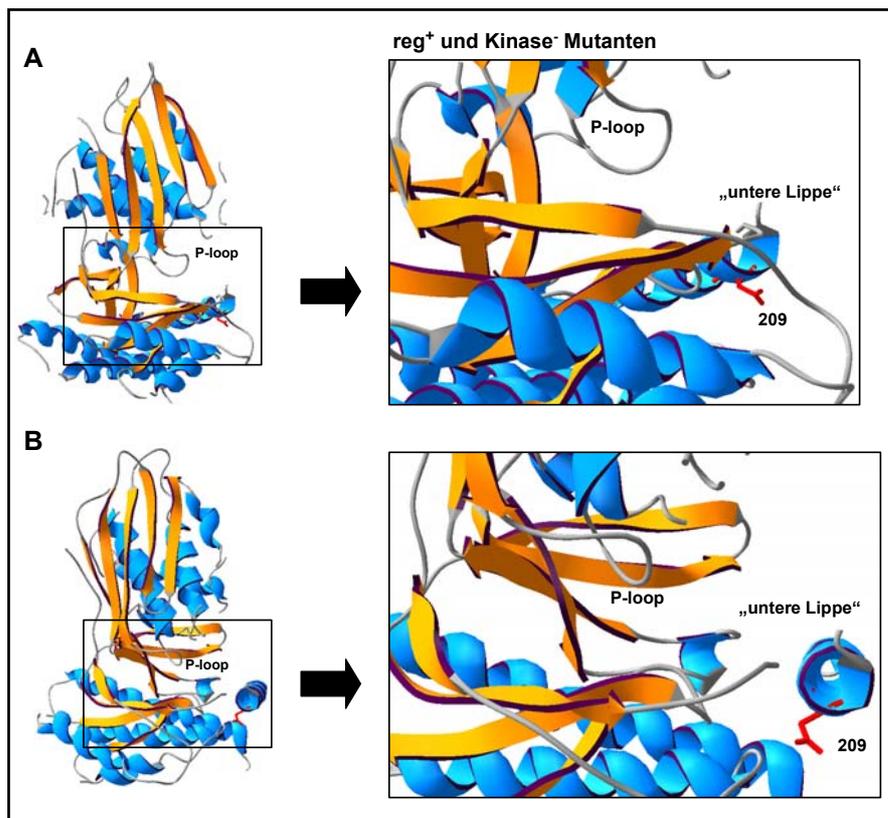
Abbildung 3.20

Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*. Dargestellt ist die regulatorisch defekte und Kinase-inaktive Mutante *gal1-HY* mit den regulatorisch defekten und Kinase-aktiven Mutanten *gal1-37* und *gal1-42*.

A: Die Mutationen, die sich hauptsächlich im C-terminalen Bereich der parallel angeordneten α -Helices befinden. B: der C-terminale Bereich um 90° gedreht.

Die dritte Gruppe umfasst nur die Mutante *gal1-209* und ist die erste Mutation die zeigte, dass die regulatorische Funktion von der Galaktokinase-Funktion getrennt werden kann (Meyer *et al.*, 1991). Die Mutante *gal1-209* hat den Aminosäureaustausch N261Y. Diese Aminosäure ist direkt in der α -Helix der unteren Lippe der Kluft lokalisiert und ist Teil einer interessanten Aminosäureabfolge (Abbildung 3.21). Das ausgetauschte Asparagin (N261) flankiert mit einem weiteren Asparagin ein reaktives Tyrosin (N₂₆₁Y₂₆₂N₂₆₃). Dieses Tyrosin kann mit seiner Ketogruppe direkt an der Phosphatgruppen-Übertragung des ATP auf Galaktose beteiligt sein und wird durch eine Amidat-Bildung der beiden Asparagine stabilisiert. Nach dem Austausch des N261 zu einem weiteren reaktiven Tyrosin kann die Phosphatgruppen-Übertragung nicht mehr gewährleistet werden, da die unterstützende Stabilisierung nicht mehr vorhanden ist. Es scheint daher durch die Destabilisierung dieser Bereiche die direkte Beteiligung dieser Region an der Galaktokinase-Funktion inhibiert zu sein.

Interessanterweise führt dieser Austausch auch zu einer um den Faktor 2 erhöhten Affinität im Two-Hybrid-System, mit den Mutanten *gal80-R10* und *gal80-S1*. Da die Mutation sich direkt in der unteren Lippe der Kluft befindet und damit in unmittelbarer Nähe zu den bereits beschriebenen Mutationen der Allele *gal1-m1*, *gal1-22* und *gal1-40* (N337S), ist dies ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung dieser Region an der Interaktion mit Gal80.

**Abbildung 3.21**

Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*. Dargestellt ist die regulatorisch intakte, aber Kinase-inaktive Mutante *gal1-209*. A: Die Mutationen, direkt in der unteren Lippe der Kluft lokalisiert. B: der C-terminale Bereich, um 90° gedreht.

Die konstitutiven Mutanten der Gruppe IV können eine Induktion vermitteln, die Galaktose unabhängig ist. Viele dieser Allele zeigten in der Two-Hybrid-Analyse und *in vivo* in *K. lactis* eine leicht erhöhte Affinität zum Gal80. Am wahrscheinlichsten erscheint die Annahme, dass die Aminosäureaustausche die Konformationsänderung durch ein gebundenes Substratmolekül vortäuschen. Interessanterweise zeigte die Kartierung der Mutationen, dass auch die konstitutiven Mutanten mit einer bestimmten Region assoziiert werden können. In Abbildung 3.22 ist eindeutig erkennbar, dass ein Großteil der konstitutiven Mutanten im Bereich des Rückgrates des aktiven Zentrums tief in der Kluft oder in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind. Die Mutationen der konstitutiven *gal1*- und *gal3*-Mutanten (-1C, -4C, -303, -311, -322 und -371) können deshalb einen direkten strukturellen Einfluss auf die Konformation des Proteins haben. Das Rückgrat des aktiven Zentrums wird durch drei vertikal verlaufenden β -Faltblätter gebildet, die antiparallel zueinander angeordnet sind. Unterhalb derer findet man mit einem horizontalem Verlauf weitere drei antiparallel verlaufende β -Faltblätter. β -Faltblattstrukturen stabilisieren sich durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen benachbarter Ketten, die parallel oder antiparallel zueinander verlaufen. Daher sind die in der Gal1-Struktur vorliegenden β -Faltblätter im Rückgrat des aktiven Zentrums besonders stabilisiert. Aminosäureaustausche mit völlig veränderten chemischen Eigenschaften können daher einen starken Einfluss auf die Öffnung der Kluft haben.

Die Aminosäureaustausche der einzelnen Mutanten (Tabelle 3.11) können dies belegen. Der Austausch S57F in der Mutante *gal1-4C* ist ein Austausch einer kleinen, leicht hydrophilen Aminosäure gegen eine relativ grosse und stark hydrophobe. Dieser Austausch ist direkt in dem äusseren vertikal verlaufenden β -Faltblatt des Rückgrates lokalisiert, welches auch als Zuckerbinderegion in der Literatur bezeichnet wird (Motiv I). Dieser Austausch hat also nicht nur einen strukturellen Einfluss in dieser Region, sondern kann sich auch direkt auf die Substratbindung auswirken.

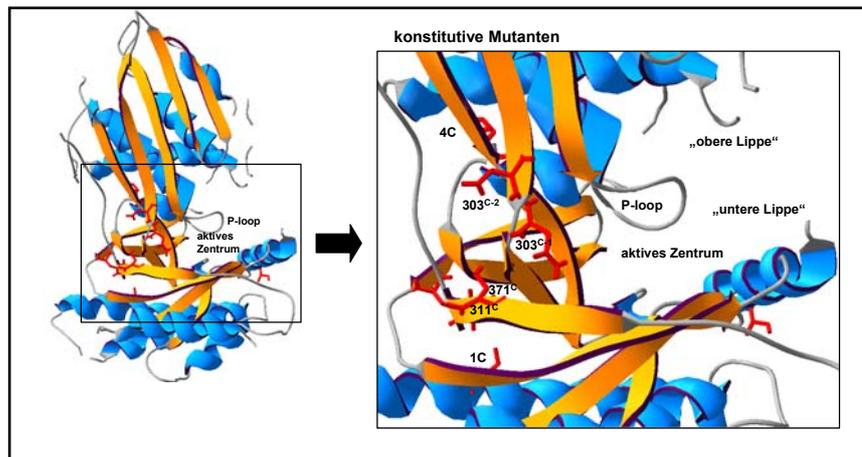


Abbildung 3.22
Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*. Dargestellt sind die konstitutiven Mutanten von Gal1 im Bereich des Backbone der tiefen Kluft die das aktive Zentrum beherbergt.

In der antiparallel dazu verlaufenden Kette V69E und D70V des *Scgal3^C-303* bewirken die Austausch durch ihre antiparallele Stellung im β -Faltblatt zueinander, eine Anordnung der sauren Seitenketten, nun in umgekehrter Stellung (Abbildung 3.22). Diese Austausche könnten einen vergleichbaren Einfluss, wie schon bei der zuvor genannten Mutation des *gal1-4C*, haben. Auch hier ist ein direktes Einwirken auf die Substratbindestelle zu erwarten und in Folge der veränderten Stellung der sauren Gruppen eine konformelle Veränderung, die nicht ausgeschlossen werden kann. In den unterhalb dieser Region verlaufenden β -Faltblättern, die eine Art Plattform des aktiven Zentrums darstellen, findet man die Austausche der *gal3*-Mutanten 311 und 371. Die Mutante 371 hat einen Austausch am äußersten Ende des C-Terminus, der das aktive Zentrum umschließt und in der Nähe der tiefen Kluft mündet. Hier liegt ein Austausch von einer leicht reaktiven und hydrophilen Aminosäure (Serin) zu einem Lysin vor, welches eine lange basische, sehr polare Seitenkette aufweist und einen stark hydrophilen Charakter hat. An gleicher Stelle kann man auch ein Prolin einsetzen mit einem vergleichbaren Phänotyp (Blank *et al.*, 1997). Dieser Austausch mimikriert sehr wahrscheinlich ein gebundenes Substratmolekül, woraus eine Konformation resultiert, die eine Bindung mit Gal80 ermöglicht.

Die Mutation der *gal3^C-311* befindet sich auf dem parallel dazu verlaufenden β -Faltblatt und mündet ebenso in der tiefen Kluft des aktiven Zentrums. Der Austausch von dem aromatischen, leicht hydrophoben Phenylalanin zu dem stark hydrophoben reaktiven Tyrosin hat den gleichen Effekt wie bei der vorhergehenden Mutante *gal3^C-371*. In der unmittelbaren Nähe dieser Mutanten findet man zudem auch die Mutation der *gal1-1C* und auch die der *gal3^C-322*. Die Mutante *gal3^C-322* ist in dem Motiv lokalisiert, welches durch das Modelling nicht erfasst werden konnte. Der Austausch von Asparaginsäure mit einer sauren, negativ geladenen Seitenkette gegen Serin, einer kleinen, leicht hydrophilen Aminosäure hat wahrscheinlich einen destabilisierenden Effekt direkt unterhalb des aktiven Zentrums. Die Mutante *gal1-1C* ist auch in diesem Bereich lokalisiert. Sie befindet sich an dem Ausläufer des fehlenden Motivs (Aminosäuren 290-370), welches mit seinem letzten Drittel diesen Bereich unterhalb der tiefen Kluft durchquert und wahrscheinlich eine Stabilisierung des aktiven Zentrums bewirkt. Durch eine Destabilisierung in diesem Bereich kann es zu einem leichten „Abknicken“ des Rückgrates nach „vorne“ kommen (von der Bildebene aus gesehen) und bewirken, dass der N-terminale und der C-terminale Bereich der oberen und unteren Lippe zusammenkommen und eine Interaktion mit Gal80 unabhängig von Galaktose ermöglichen. Diese Mutationen scheinen allerdings nur eine Art von Zwischenstadium darzustellen, da nach Zugabe von Galaktose in fast allen Fällen noch eine Steigerung der Induktion beobachtet werden kann. In der Abbildung 3.23 A und B ist verdeutlicht, wie die Region um den P-loop herum stabilisiert ist und welchen Effekt Einzel-Aminosäureaustausche hier haben könnten.

Die α -Helix und das β -Faltblatt des P-loops sind durch verschiedene elektrostatische Wechselwirkungen mit den dahinter liegende α -Helices stabilisiert. Wie in der Abbildung 3.23 B zu sehen ist, gibt es stabilisierende Wechselwirkungen über delokalisierte π - \bar{e} der Aminosäuren Tryptophan 114, Tyrosin 117, Phenylalanin 118 und Phenylalanin 162. Dieses Wechselspiel wird scheinbar dramatisch verändert durch die Einführung eines weiteren Phenylalanins an Position 146 anstelle eines Valins (*galI-10d*) oder durch den Austausch des Tryptophans 114 durch ein Valin (*galI-14*). Beide Austausche resultieren in einem Verlust der regulatorischen Aktivität. Einen weiteren stabilisierenden Effekt kann man durch die Ausbildung einer möglichen Schwefelbrücke zwischen den Cysteinen an Position 164 der α -Helix des P-loops und an Position 225 beobachten. Beide Schwefelreste (gelb) liegen in direkter Nachbarschaft zueinander und können in Wechselwirkung treten.

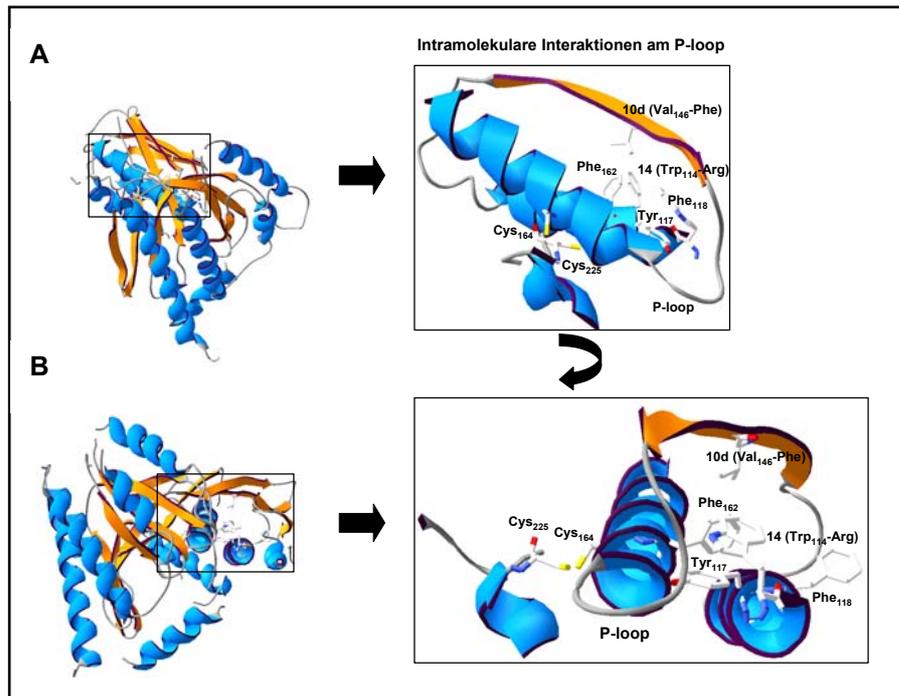


Abbildung 3.23

Homologie-Modell der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis*. A: Dargestellt sind verschiedene intermolekulare Wechselwirkungen im Bereich oberhalb des P-loops. B: der gleiche Bereich, um 90° gedreht.

3.8.3 Vorhersage eines Strukturmodells von Gal80

Ein Strukturmodell für Gal80 konnte, wie schon zuvor mit den Proteinen Gal1 und Gal3, durch das automatische Homologie-Modelling mit Hilfe des Programms MODBASE[®] (Pieper *et al.*, 2002) erstellt werden. Mit den Sequenzen von Gal80 aus *K. lactis* und Gal80 aus *S. cerevisiae* wurde eine Struktur gefunden, die eine höchst mögliche Korrelation von 1 aufweist (Abbildung 3.24). Es handelt sich dabei um die Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis*. Die GFOR aus *Z. mobilis* ist ein periplasmatisches Enzym, welches durch eine gekoppelte Reaktion einer Reduktion von Fruktose und einer Oxidation von Glukose lösliches Sorbitol und Gluconolacton bildet und so das Bakterium vor osmotischem Schock schützt. Die GFOR bildet wie Gal80 dimere-, aber auch ternäre-Komplexe, die physiologisch relevant sind. Durch die Multimerisierung kann eine klassische Dinucleotidbindedomäne ausgebildet werden, die NADP als Co-Faktor binden kann (Kingston *et al.*, 1996).

Automatische Modellierung von Gal80														
TARGET					MODEL DATA					TEMPLATE				
Model/Fold Reliability	Sequence based View	Select Sequence Database Links	Database Description	Organism	Protein Size	Modeled Segment	Size	Seq. Id (%)	E. value	Model Score	PDB code	Template based View	Segment	Description
		-SA Q06433	GALACTOSE/LACTOSE METABOLISM REGULATORY PROTEIN GAL80	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	457	5-314	310	15.00	2e-48	1.00	1ofn A		6-298	GLUCOSE-FRUCTOSE OXIDO-REDUCTASE
↑					↑					↑				
sehr vertrauenswürdig					sehr niedriger e-value					höchste Korrelation				

Abbildung 3.24

Automatisches Homologie-Modelling mit MODBASE[®]. Für die Sequenz von Gal80 aus *K. lactis* konnte mit der Struktur der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* ein vertrauenswürdiges Strukturmodell gefunden werden.

Die Funktion der GFOR unterscheidet sich erheblich von dem transkriptionellen Repressor Gal80. Daher stellt sich berechtigt die Frage nach der Relevanz, der über das Homologie Modelling gefundenen Struktur. Um dies zu klären, wurde wie schon bei den Galaktokinasen, ein Protein-Alignment von Gal80 aus *K. lactis*, Gal80 aus *S. cerevisiae* und GFOR aus *Z. mobilis* mit einem Vergleich der sekundären Strukturen gemacht (Abbildung 3.25). Gal80 und FGOR weisen eine Identität von 15% auf. Im N-terminalen Bereich bis zur Aminosäure 115 ist nur eine geringe Übereinstimmung der Sekundärstrukturen erkennbar. Nachfolgend ist dann aber kaum ein Unterschied zu sehen. Der Unterschied im N-terminalen Bereich (1-114) ist darin begründet, dass in diesem Bereich 51 Aminosäuren liegen, die die Lokalisierung der GFOR im Periplasma veranlassen sowie mit dieser Region einen ternären Komplex der GFOR stabilisieren (Kingston *et al.*, 1996). Gal80 bildet nur Dimere, die lediglich transient mit einem weiteren Dimer von Gal80 interagieren können. Die Stabilisierung der dimeren Struktur erfolgt hauptsächlich über die Bindung der Gal4-Dimere auf dem *GAL*-Promotor (Melcher, 2001).

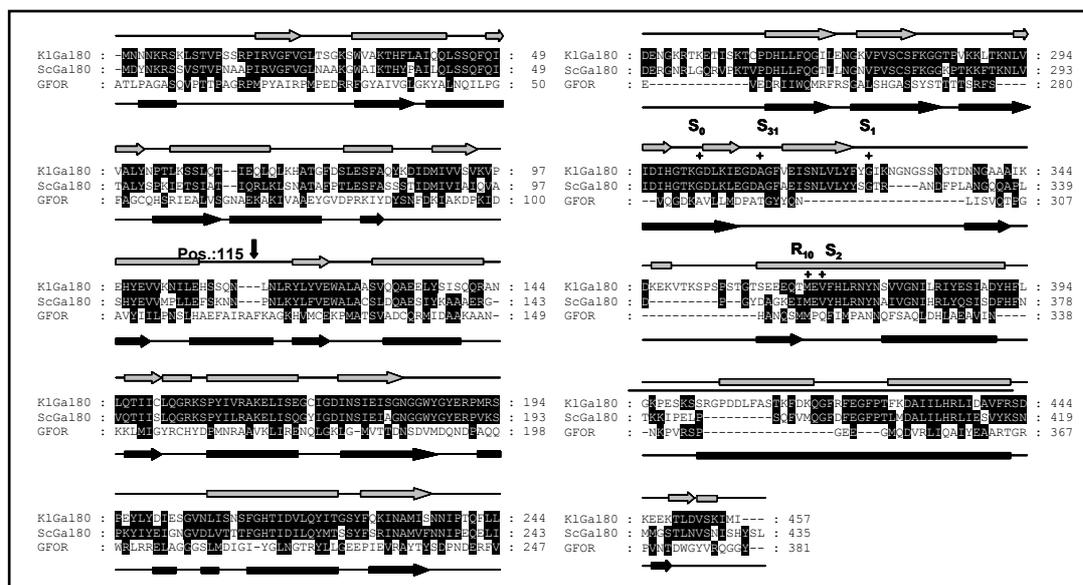
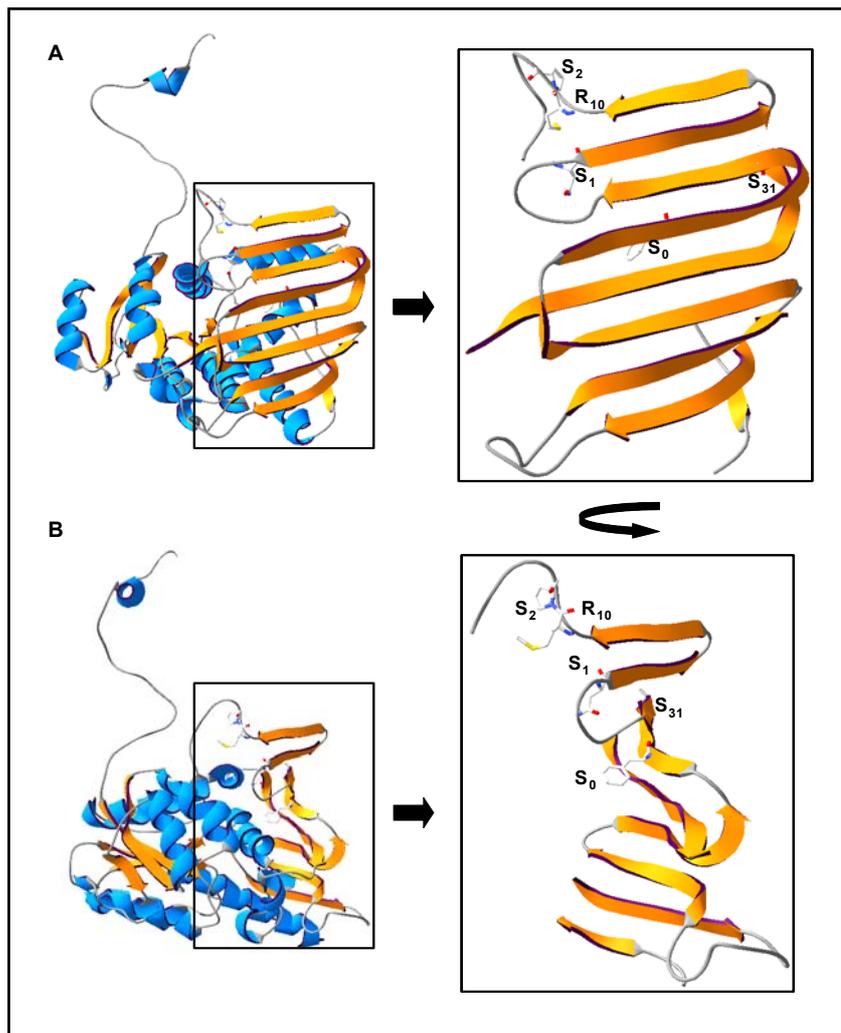


Abbildung 3.25

Vergleich der Sekundärstruktur zwischen Gal80 aus *K. lactis*, Gal80 aus *S. cerevisiae* und der Glukose-Fruktose-Oxido-Reduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* (10FG, Kingston *et al.*, 1996) Die Sekundärstruktur Vorhersage für Gal80 wurde mit dem Programm NPS@ (Network Protein Sequence Analysis: Combet *et al.*, 2000) erstellt. Mit den gefüllten Rechtecken, sind die α -Helices dargestellt, mit den gefüllten Pfeilen die β -Faltblätter und mit der einfachen Linie, die unstrukturierten Bereiche. In dem Alignment sind die Positionen der Gal80-Mutationen gal80-S0, -S1, -S2, -S31 und -R10 kenntlich gemacht.

In dem Alignment ist die Lage der Gal80-Mutationen kartiert. Diese befinden sich in einer strukturell interessanten Region von neun aufeinander folgenden β -Faltblättern. (Abbildung 3.26). Wie von Kingston *et al.* (1996) gezeigt, kann die GFOR über dieses Motiv dimerisieren.

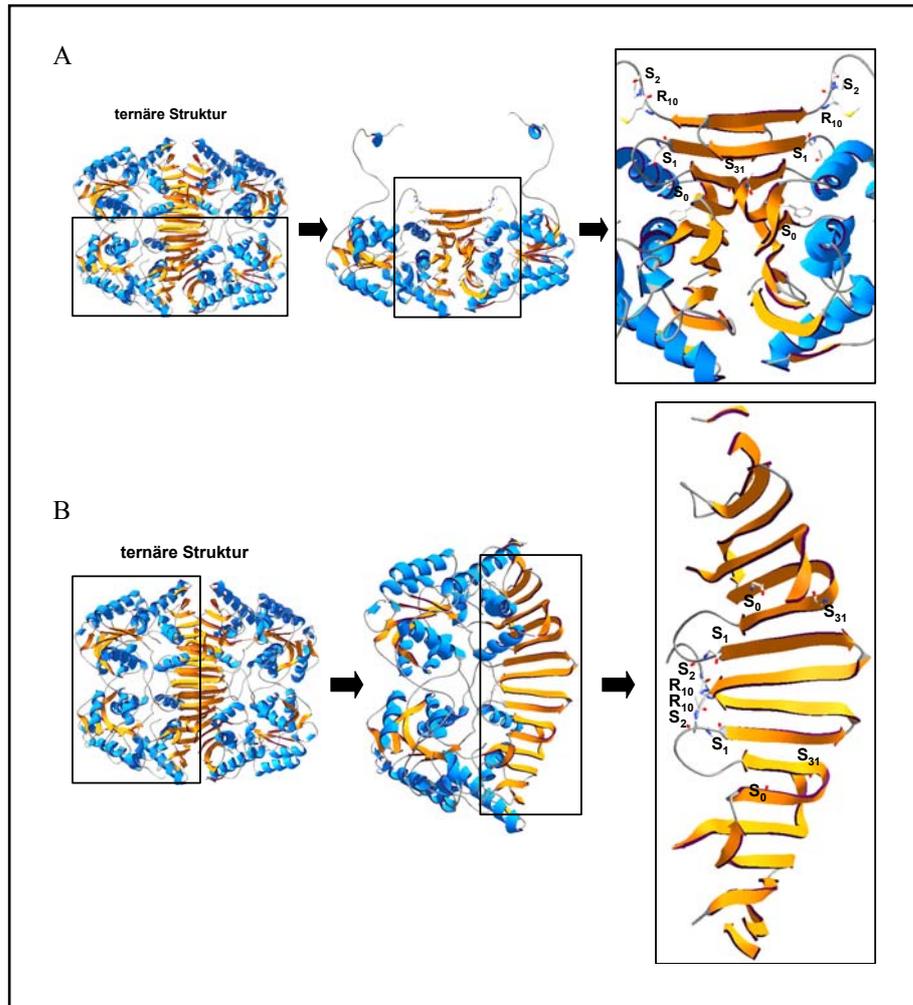
Allgemein hat die GFOR insgesamt zwei ausgeprägte Domänen am N- und am C-terminus. Sie sind zwar nur locker miteinander über verschiedene Loops assoziiert, aber dennoch dicht zusammengepackt. Die N-terminale Domäne hat ein klassisches Dinukleotidbinde-Motiv, welches NADP binden kann. Dieses wird aus drei parallel verlaufenden β -Falblättern und zwei flankierenden α -Helices gebildet, einer sogenannten $\beta\alpha\beta$ -Anordnung (Kingston *et al.*, 1996). Die C-terminale Domäne wird durch ein dominierendes Motiv von neun antiparallel verlaufenden β -Faltblätter gebildet, in deren Zentrum ein hervorgehobenes β -Faltblatt liegt. Diese Domäne bildet ein sogenanntes Interface für Proteininteraktionen innerhalb eines Komplexes. In Abbildung 3.26 ist dieses Motiv sowohl im Verbund mit der kompletten Proteinstruktur des Monomers als auch freigestellt ersichtlich. Die Mutationen der Gal80 Allele sind in diesem Interface lokalisiert und bewirken in Gal80 veränderte reprimierende Eigenschaften (Superrepression) und Interaktionen mit Gal1.

**Abbildung 3.26**

Struktur eines Monomers der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* (1OFG, Kingston et al., 1996)

A: Aufgrund der Vergleiche der Sekundärstruktur von Gal80 und GFOR wurden die Positionen der Gal80-Mutationen gal80-S0, -S1, -S2, -S31 und -R10 kenntlich gemacht. B: Struktur um 90° gedreht.

Wie in der Abbildung 3.27 ersichtlich kann die GFOR über das Strukturmotiv der neun antiparallel zueinander angeordneten β -Faltblätter in verschiedenster Weise dimerisieren. Die Dimerisierung kann direkt „face to face“ erfolgen (Form I, Abbildung 3.27 A), wobei die Dimerisierung über das im Zentrum liegende β -Faltblatt stattfindet. Die Lage der Gal80-Mutationen direkt im Zentrum der Dimerisierungsdomäne könnten Hinweise dafür sein, dass die Dimerisierung von Gal80 beeinflusst wird. Die zweite Form der Dimerisierung (Form II, Abbildung 3.27 B) erfolgt nicht, wie bei der ersten Form „face to face“, sondern senkrecht um 180° zueinander verdreht. Mit dieser Art von Dimerisierung wird erreicht, dass aus den neun antiparallel angeordneten β -Faltblättern 18 geworden sind. Diese 18 antiparallel in einer Reihe liegenden β -Faltblätter bilden so eine grosse Plattform für Protein-Protein-Interaktionen. Die GFOR bildet über dieses Motiv in Kombination mit der ersten Form der Dimerisierung eine ternäre Struktur, die physiologisch relevant ist (Kingston *et al.*, 1996). In allen Formen der Dimerisierung sind die Gal80-Mutationen in unmittelbarer Nähe der Dimerisierungsdomänen lokalisiert. Es ist somit auch nicht auszuschließen, dass die Phänotypen dieser Mutationen in Bezug auf ihre Interaktionen mit Gal1 und Gal4 durch ein verändertes Verhalten der Dimerisierung bedingt sein können.

**Abbildung 3.27**

Struktur des ternären Komplexes und der zwei möglichen Dimere (Form I und II) der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* (1OFG, Kingston et al., 1996). A: Form I; B: Form II; Aufgrund der Vergleiche der Sekundärstruktur von Gal80 und GFOR wurden die Positionen der Gal80-Mutationen gal80-S0, -S1, -S2, -S31 und -R10 kenntlich gemacht.

3.9 Lokalisierung der Proteine Gal1 und Gal80 in *K. lactis*

3.9.1 Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP) der Proteine Gal1 und Gal80 *in vivo*

Die Chromatin-Immuno-Präzipitation (CHIP) ist eine Möglichkeit, Proteine nachzuweisen, die mit dem Chromatin-DNA-Komplex assoziiert sind. Wir entwickelten einen CHIP, basierend auf einem *in vivo*-Crosslinking mit Formaldehyd, um die Bindung der Proteine Gal80 und Gal1 an die UAS_{GAL} -Region des $GAL1/10$ -Promotors nachzuweisen. Da beide Proteine nicht DNA gebunden vorliegen, funktioniert dieser Nachweis, wenn Gal80 über Gal4 an den Chromatin-DNA-Komplex gebunden ist und Gal1 an Gal80 über den Komplex Gal80-Gal4. Nach Anzucht über die Hefe-Stämme unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen [2% Glycerin, 3% Lactat und 0.05% Glukose (nicht induziert) zusätzlich mit 2% Galaktose für 20 min (induziert)], wurden die Proteine mit Formaldehyd an den Chromatin-DNA-Komplex kovalent vernetzt. Nach Isolierung sämtlicher chromosomaler DNA mit den daran vernetzten Proteinen wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt, um kleine DNA-Fragmente mit einer statistischen Grösse von 0,5-1 Kb zu erhalten. Diese Fragmente wurden dann mit spezifischen Antikörpern gegen Gal1 oder Gal80 inkubiert und die Fragmente mit den assoziierten Proteinen Gal1 oder Gal80 präzipitiert. Nach Revertierung des Crosslinkings und Aufreinigung der beteiligten DNA-Fragmente wurde eine

quantitative PCR der Bereiche der UAS_{GAL}-Region des *GAL1/10*-Promotors (~ 300bp) und einer nicht involvierten Region zur Kontrolle gemacht (*FUS1*-Gen; ~ 250bp). Durch einen Vergleich der erhaltenen Produkte der UAS_{GAL}-Region und des *FUS1*-Gens nach Quantifizierung mit Scion Image® kann ein Quotient ermittelt werden, der die Anreicherung eines Produktes unter bestimmten Bedingungen wiedergibt.

In Abbildung 3.28 sind die CHIPs der Wildtyp-Stämme KB6-2C und JA6 dargestellt. Unter nicht-induzierenden Bedingungen ist eine Akkumulierung von Gal80 auf dem *GAL1/10*-Promotor in beiden Stämmen deutlich erkennbar. In Abwesenheit von Galaktose bindet Gal80 an Gal4 und reprimiert die Transkription der *GAL*-Gene. Unter diesen Bedingungen ist mit einem Quotienten von etwa 2, die Menge an gebundenem Gal1 im Zellkern um den Faktor 4-5 geringer als die des Gal80. Da die Bedingungen mit 2% Glycerin, 3% Lactat und 0,05% Glukose nicht komplett reprimierend sind, ist die Menge von Gal1 im Kern als basales Niveau zu betrachten. Gibt man dem Medium nun Galaktose hinzu, ist eine Abnahme der Gal80-Konzentration um den Faktor 2 zu beobachten. Die Menge an gebundenem Gal1 hingegen nimmt gleichzeitig etwa um den gleichen Faktor zu. Somit ist in Anwesenheit von Galaktose eine Zunahme von Gal1 im Kern und parallel dazu eine Abnahme von Gal80 gezeigt. Auffällig ist, dass die Menge an Gal1 und Gal80 unter induzierenden Bedingungen nahezu stöchiometrisch ist (1:1). Dies würde der Annahme entsprechen, dass in *K. lactis* die Dimerisierung von Gal80 durch die Anwesenheit von Galaktose destabilisiert würde und Gal1 ein Monomer von Gal80 auf dem *GAL*-Promotor über Gal4 bindet. Das freie entstehende andere Monomer von Gal80 wird im Zuge dessen wahrscheinlich ins Cytoplasma transportiert und von weiteren Gal1-Molekülen gebunden werden.

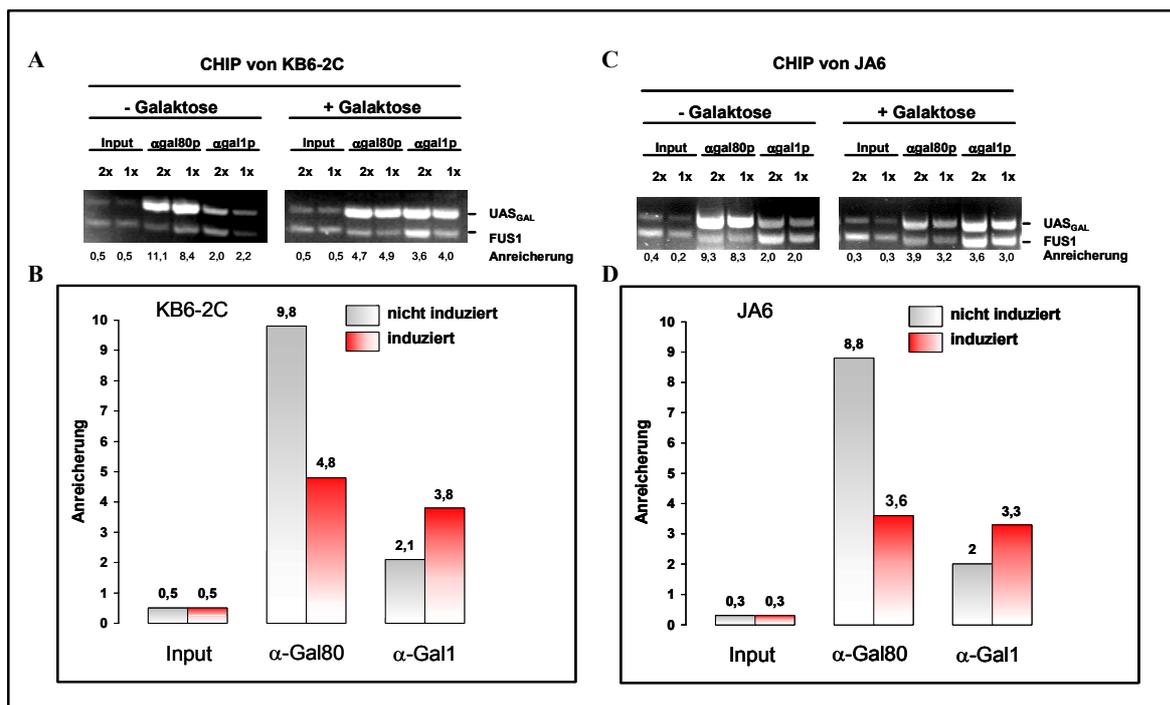


Abbildung 3.28

Analyse der Assoziation der Proteine Gal1 und Gal80 an die UAS_{GAL}-Sequenz des *GAL1/10*-Promotors mittels Chromatin-Immuno-Präzipitation in den Stämmen KB6-2C und JA6.

A: PCR-Produkte der UAS_{GAL}-Region (300bp) und einer Region des *FUS1*-Gens (250bp), welches Gal4-unabhängig im Stamm KB6-2C kontrolliert wird. B: Quantifizierung der PCR-Produkte unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen im Stamm KB6-2C. C: PCR-Produkte der UAS_{GAL}-Region (300bp) und einer Region des *FUS1*-Gens (250bp), welches Gal4-unabhängig im Stamm JA6 kontrolliert wird. D: Quantifizierung der PCR-Produkte unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen im Stamm JA6. 2x: doppelte Menge aufgetragen; 1x: einfache Menge aufgetragen.

Die bisherigen CHIP-Versuche haben eindeutig zeigen können, dass Gal80 in Anwesenheit von Galaktose und Gal1 den *GAL*-Promotor zu 50% verläßt. Die Frage, ob dies durch Gal1 vermittelt wird, sollte im Stamm JA6D1R ($\Delta gal1$) geklärt werden. Die Abbildung 3.29 A und B zeigt, dass die Menge an Gal80 auch in diesem Stamm unter induzierenden Bedingungen nahezu um 50% reduziert wird. Durch die Abwesenheit

von Gal1 ist jedoch die Transkription der *GAL*-Gene auf einem Level unterhalb des dereprimierten Zustands, aber noch oberhalb einer durch Glukose vermittelten Repression. Die quantifizierte Menge von Gal1 mit einem Quotienten von nahezu 1 entspricht dem des Hintergrunds des *FUS1*-Gens und ist somit zu vernachlässigen. Wenn Gal1 an der Destabilisierung der Gal80-Dimere aktiv beteiligt wäre, hätte man unter beiden Bedingungen ein gleiches Ergebnis ermitteln müssen. Es ist zu sehen, dass auch in Abwesenheit von Gal1 die Menge an Gal80 wie schon zuvor in Anwesenheit von Gal1 und Galaktose, um den Faktor 2 reduziert wird. Einzig durch die Anwesenheit von Galaktose wird daher der Gal80-Komplex destabilisiert, was dazu führt, dass wahrscheinlich ein Gal80-Monomer gebunden bleibt und ein weiteres den Promotor verlässt. Die Destabilisierung der dimeren Struktur ist aber nicht ausreichend, die Repression aufzuheben, da dieser Stamm nicht mehr auf Galaktose wachsen kann (Tabelle 3.4 und 3.5). Somit kann zwar in Abwesenheit von Gal1 der Gal80-Komplex destabilisiert werden, aber erst in Anwesenheit von Gal1 kann die Repression aufgehoben werden. Um zu zeigen, dass die zuvor ermittelte Anreicherung von Gal1 dennoch über die Bindung von Gal80 an den Promotor erfolgt, wurde ein CHIP-Experiment mit dem *GAL80*-Deletions-Stamm JA6D802R durchgeführt. Sollte die Bindung von Gal1 über Gal80 verlaufen, dann müsste in diesem Stamm keine Anreicherung unter induzierenden Bedingungen von Gal1 quantifiziert werden können. In Abbildung 3.29 C und D ist erkennbar, dass weder unter nicht-induzierenden Bedingungen noch unter induzierenden Bedingungen eine Anreicherung von Gal1 oder Gal80 gemessen werden konnte. Die angegebenen Werte der Quantifizierung geben lediglich den Hintergrund der Immunpräzipitation wieder. Es bestätigt sich daher, dass die Bindung von Gal1 über Gal80 an den Promotor erfolgt und dort wahrscheinlich, anders als von Peng und Hopper (2002) in *S. cerevisiae* gezeigt, die Derepression vermittelt wird.

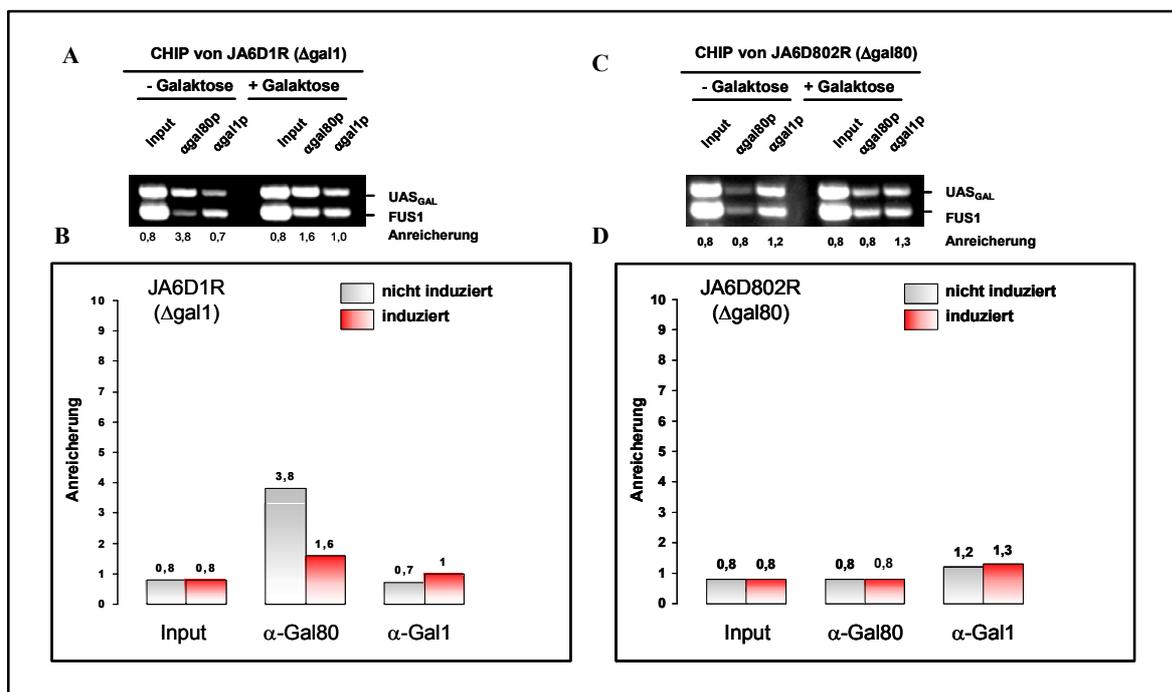


Abbildung 3.29

Analyse der Assoziation der Proteine Gal1 und Gal80 an die UAS_{GAL}-Sequenz des *GAL1/10*-Promotors mittels Chromatin-Immuno-Präzipitation in den Stämmen JA6D1R ($\Delta gal1$) und JA6D802R ($\Delta gal80$).

A: PCR-Produkte der UAS_{GAL}-Region (300bp) und einer Region des *FUS1*-Gens (250bp), welches Gal4-unabhängig im Stamm JA6D1R kontrolliert wird. B: Quantifizierung der PCR-Produkte unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen im Stamm JA6D1R. C: PCR-Produkte der UAS_{GAL}-Region (300bp) und einer Region des *FUS1*-Gens (250bp), welches Gal4-unabhängig im Stamm JA6D802R kontrolliert wird. D: Quantifizierung der PCR-Produkte unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen im Stamm JA6D802R.

In den CHIP-Analysen konnte somit gezeigt werden, dass eine mögliche Destabilisierung des dimeren Gal80-Komplexes über ein Galaktose-abhängiges Signal abläuft und so eine Interaktion von Gal1 mit Gal80 im Kern ermöglicht. Die Monomere von Gal80, die vom Promotor gelöst werden, verlassen wahrscheinlich den Kern und

werden im Cytoplasma von Gal1 gebunden und zurückgehalten. Desweiteren ergaben sich Hinweise, dass eine Bindung von Gal1 an ein Monomer von Gal80 nötig ist, um die Repression aufheben zu können. Die Wechselwirkung von Gal1 und Gal80 in *K. lactis* unter induzierenden Bedingungen findet in einem nahezu stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 im Kern statt.

3.9.2 Immunfluoreszenz-Analyse der Proteine Gal1 und Gal80 im *K. lactis*-Stamm JA6

Die Immunfluoreszenz ist eine Möglichkeit, die Lokalisierung bestimmter Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen in der Zelle nachzuweisen. Um die Lokalisierung der Proteine Gal1 und Gal80 unter reprimierenden und induzierenden Bedingungen verfolgen zu können, verwendeten wir die spezifischen Primär-Antikörper gegen Gal80 (Zenke, 1995) und Gal1 (Meyer, 1991). Da beide Antikörper aus dem Kaninchen stammen, konnten sie mit dem sekundären, monoklonalen Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Cy3 (Sigma), unter dem Fluoreszenzmikroskop in der Zelle sichtbar gemacht werden. Mittels DAPI-Anfärbung konnte neben dem Signal für die Proteine Gal1 und Gal80 auch die intrazelluläre DNA sichtbar gemacht werden, die hauptsächlich im Kern zu finden ist. Als Kontrollen für kernlokalisierte Proteine wurden die Fusionsproteine VP16Gal80 und lexAGal1 im Two-Hybrid-Stamm CTY10-5d mit spezifischen Primär-Antikörpern gegen VP16 und LexA detektiert. In Abbildung 3.30 ist ersichtlich, dass lediglich mit VP16Gal80 ein Signal im Kern sichtbar gemacht werden konnte. Mit dem LexA-Antikörper konnte kein Signal detektiert werden. Dieser Antikörper scheint speziell für Westernblot-Analysen generiert zu sein. Abbildung 3.30 zeigt im *K. lactis*-Stamm JA6 die Verteilung der Proteine Gal1 und Gal80 unter reprimierenden (Glukose) und induzierenden Bedingungen (Galaktose).

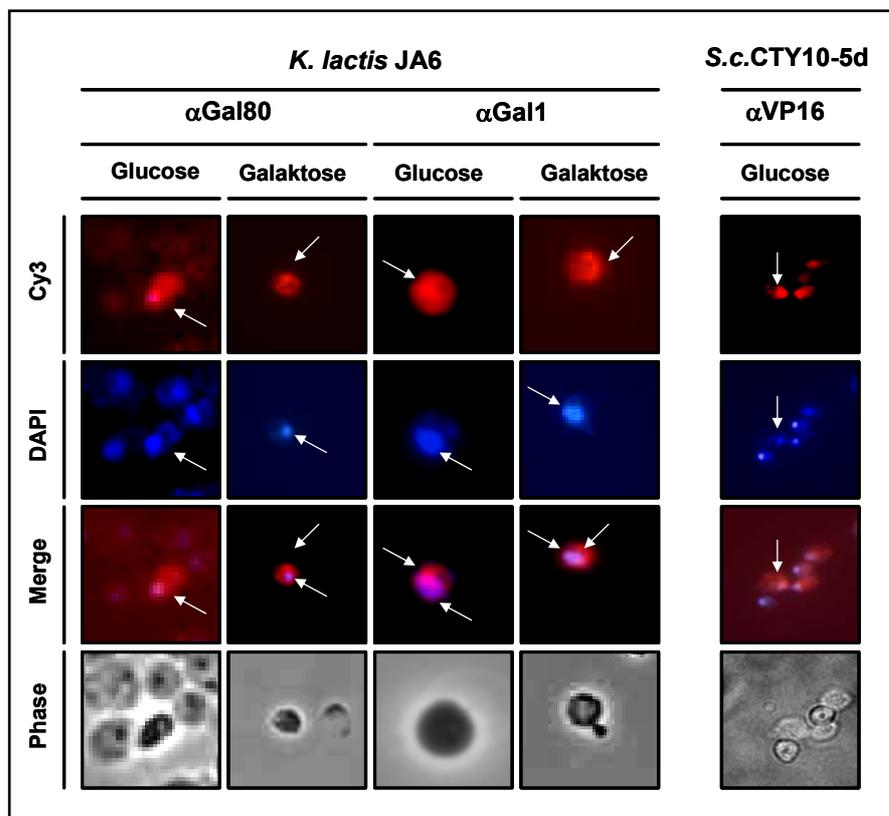


Abbildung 3.30

Immunfluoreszenz-Analyse der Proteine Gal1 und Gal80 im Stamm JA6. Der Nachweis der Proteine in der Zelle erfolgte mit spezifischen Primär-Antikörpern gegen Gal1 (Meyer, 1991) und Gal80 (Zenke, 1995). Mit einem sekundären Antikörper, gekoppelt an Cy3, konnten die Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zur Kontrolle einer Kernlokalisierung wurde neben der DAPI-Anfärbung der Two-Hybrid-Stamm CTY10-5d mit Antikörper gegen VP16 und LexA inkubiert. Beide Proteine sollten zur Transkriptionsaktivierung in den Kern gelangen müssen. Die Pfeile markieren die hauptsächlichsten Spots der Proteine und der DNA.

Auf Glukose ist Gal80 vor allem im Kernbereich zu sehen. Gal1 wird unter diesen Bedingungen fast ausschliesslich im Cytoplasma detektiert. Auf Galaktose verändert sich die Verteilung von Gal80 hauptsächlich vom Zellkern in das Cytoplasma. Im Kern ist trotz der zuvor im CHIP ermittelten Ergebnisse kein Gal80 nachzuweisen. Die

Mengen an Gal80 scheinen zu gering zu sein, um detektiert zu werden. Gal1 ist nur im Cytoplasma sichtbar. Ein Signal im Kern ist nicht zu sehen.

3.9.3 Lokalisierung von GFPGal1 in *K. lactis* und *S. cerevisiae*

In Abbildung 3.31 ist die Verteilung der GFPGal1-Fusionsproteine in den Stämmen *K. lactis* JA6D1R und *S. cerevisiae* JD52 dargestellt. Es ist erkennbar, dass GFP ohne Fusion cytoplasmatisch verteilt ist. Durch die Fusion an Gal1 (GFPGal1) wird diese Lokalisierung nicht verändert, was dafür spricht, dass auch GFPGal1 cytoplasmatisch vorliegt. Kloniert man an GFP einen myr-Tag (myrGFP; Jansen, pers. Mitteilung) ist eine Lokalisierung in der Zellmembran und Plasmamembran verschiedener Zellorganellen zu beobachten. Mit dem myr-Tag können Proteine in Membranen verankert werden. Im Vergleich dazu ist die Verteilung der Fusion von GFPGal1 mit dem myr-Tag (myrGFPGal1) nach wie vor hauptsächlich cytoplasmatisch. Die ausbleibende Membran-Verankerung des myrGFPGal1 im *K. lactis*-Stamm sollte in einem weiteren Test in dem *S. cerevisiae*-Stamm JD52 geprüft werden (Abbildung 3.31 B). Auch hier ist erkennbar, dass die Verteilung der Fusionsproteine vergleichbar mit derjenigen im Stamm JA6D1R ist. Die Myristylierung scheint in der Fusion mit GFP allein zu funktionieren, jedoch mit Gal1 auszubleiben. Die Fusionsproteine in *K. lactis* konnten aber eine *GAL1*-Deletion auf Galaktose komplementieren (Daten nicht gezeigt).

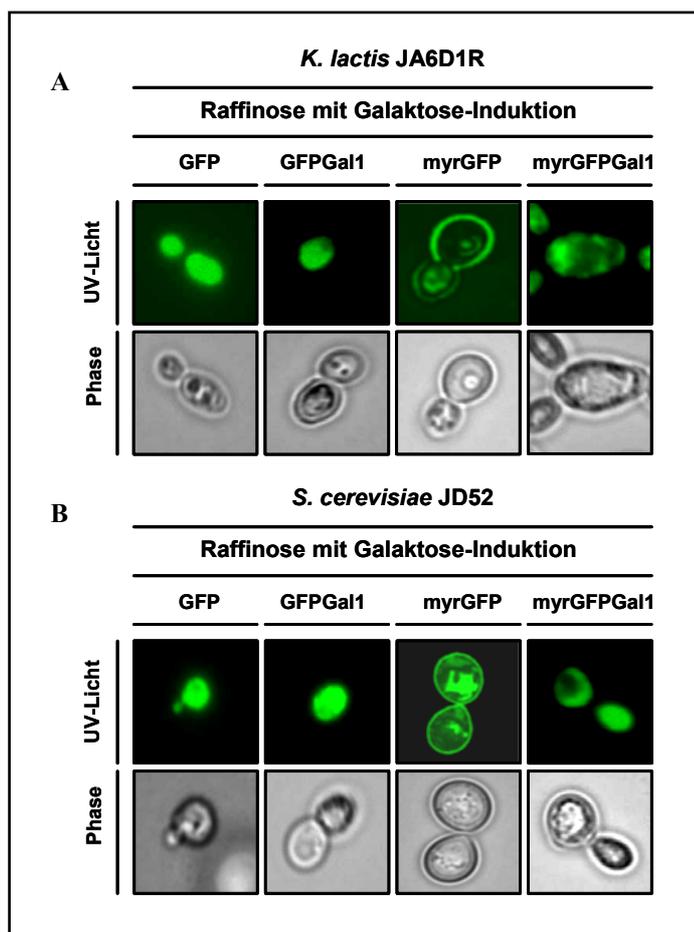


Abbildung 3.31

GFP-Sichtung der Fusionsproteine von Gal1. In den Stämmen A: *K. lactis* JA6D1R und B: *S. cerevisiae* JD52 sollte mit Hilfe eines myr-Tags (siehe Text) das Protein Gal1 in der Zellmembran verankert werden und deren Einfluss auf die Transkription der *GAL*-Gene beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1 Die regulatorische Funktion und die Galaktokinase-Aktivität von Gal1 aus *K. lactis* können durch Aminosäureaustausche inhibiert werden

In biochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Galaktose und ATP mit Gal1 aus *K. lactis* und Gal3 aus *S. cerevisiae* eine Komplexbildung mit dem Repressor Gal80 vermittelt (Zenke *et al.* 1996; Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996 und 1997). Two Hybrid-Analysen konnten weiter zeigen, dass eine spezifische Galaktose-abhängige Interaktion der Proteine Gal1 und Gal80 nötig ist für die Induktion der *GAL*-Gene in *K. lactis* (Vollenbroich *et al.*, 1999). Platt und Reece (1998) konnten zudem in einem *in vitro*-System einen trimeren Komplex von Gal4, Gal80 und Gal3 auf der *UAS_{GAL}*-Sequenz unter induzierenden Bedingungen nachweisen. Es wurde daraus geschlossen, dass Gal3 und/oder Gal1 an einem Gal80/Gal4-Komplex im Kern bindet, um die Gal80-Repression aufzuheben (Zenke *et al.*, 1996; Yano und Fukasawa, 1997; Platt und Reece, 1998; Sil *et al.*, 1999). Die Funktion von Gal1 als Galaktokinase deutet jedoch an, dass Gal1 ein essentielles cytoplasmatisches Protein ist. Kürzlich konnten Peng und Hopper (2000 und 2002) eine hauptsächliche Lokalisierung von Gal3 im Cytoplasma zeigen. Die Autoren schliessen, dass Gal3 nur im Cytoplasma Gal80 bindet (Peng und Hopper 2002). Nicht klar ist jedoch, ob dies die einzige Möglichkeit ist, wie Gal3 oder Gal1 in Interaktion mit Gal80 den Prozess der Induktion vermitteln. Eine direkte Bindung von Gal1 mit dem Gal80/Gal4-Komplex auf der DNA ist vor allem in *K. lactis* noch nicht ausgeschlossen.

Um die Funktion von Gal1 in einem Gal1/Gal80-Komplex und möglicherweise in Interaktion mit Gal4 besser verstehen zu können, ist es wichtig, die Interaktion dieser Moleküle genauer zu kennen. In Weiterführung an vorangehende Arbeiten, in denen bereits Mutationen von *GAL1* erzeugt wurden, haben wir zunächst versucht weitere *GAL1*-Mutationen zu identifizieren, die einen stärkeren Phänotyp bezüglich der regulatorischen Funktion und/oder der Kinase-Aktivität aufzeigen. Mutations-Analysen des *GAL1* aus *K. lactis* (Vollenbroich *et al.*, 1999, Menezes pers. Mitteilung) zeigten neben konstitutiven Mutationen auch Mutationen auf, die zu einem völligen Funktionsverlust führten oder zu einem partiellen Verlust einer der beiden Funktionen. In dem hier benutzten Phänotyp-Screen wurden die Mutanten *gall-22*, *gall-37*, *gall-40*, *gall-42*, *gall-HY* und *gall-BB* generiert und mit den bereits publizierten Mutanten *gall-209*, *gall-m1*, *gall-m2*, *gall-d* und denen von R. Menezes isolierten Mutanten *gall-14*, *gall-18*, *gall-1C*, *gall-2C* und *gall-4C* in einer Two-Hybrid-Analyse und einem Kinase-Test in *S. cerevisiae* verglichen. In einer anschließenden *in vivo*-Analyse in *K. lactis* sollten die ermittelten Phänotypen bestimmt werden. Die Austausche der Mutationen und ihre Phänotypen sind in Tabelle 3.12 ersichtlich.

Die Mutanten von Gal1 können generell in vier verschiedene Gruppen unterteilt werden. **Typ I:** regulatorisch defekt, aber noch Kinase-positiv (*gall-22*, *gall-40*, *gall-37* und *gall-42*); **Typ II:** regulatorisch aktiv, aber Kinase-defekt; **Typ III:** defekt in beiden Funktionen (*gall-HY*) und **Typ IV:** konstitutiv aktiv, unabhängig von der Kohlenstoffquelle (*gall-BB*). Die Mutanten *gall-22* und *gall-40* zeigten einen vergleichbaren Phänotyp wie die Mutanten *gall-14* und *gall-18* von R. Menezes. Im Gegensatz zu diesen beiden Mutationen, die sich im N-terminalen Bereich befinden, sind die Mutationen von *gall-22* und *gall-40* im C-terminalen Bereich lokalisiert und repräsentieren eine weitere Region für eine mögliche Interaktion von Gal1 mit Gal80. Die Null-Mutante *gall-HY* und die Typ II-Mutanten *gall-37* und *gall-42* sind Mutationen, die wahrscheinlich nicht direkt an der Interaktion beteiligt sind. Wie *gall-10d* (Vollenbroich *et al.*, 1999) sind sie in einer Region lokalisiert, die für die Integrität und die Funktionalität des Proteins wichtig zu sein scheint. Die Mutation von *gall-10d* ist direkt im P-loop lokalisiert und hat einen direkten Einfluss auf die Substrat-Bindestellen für ATP und Galaktose. Die Mutationen von *gall-HY*, *gall-37* und *gall-42*

sind im C-terminalen Bereich lokalisiert, in der drei β -Faltblätter von je zwei α -Helices flankiert werden. Dieses Motiv bildet eine Art „Fuß“ und scheint für die Stabilität der Struktur erheblich zu sein. Mit diesen Mutationen konnte somit eine weitere Region aufgezeigt werden, die einen direkten Einfluss auf die Struktur hat und somit zu einem Funktionsverlust von Gal1 führt, wenn sich die Struktur in diesem Bereich verändert. Die Mutante *gall-BB*, die im Two-Hybrid-System einen konstitutiven Phänotyp hat, liegt auch unmittelbar in diesem Bereich. Der Vergleich zu den anderen konstitutiven Mutationen *gall-1C*, *gall-2C*, *gall-4C* und *gall-d* zeigt, dass die Mutante *gall-BB* zwar eine stärkere Galaktose-unabhängige Interaktion mit Gal80 in der Überexpressions-Situation zeigt, diese aber in niedriger Kopienzahl nicht beobachtet werden kann. Zudem weist *gall-BB* eine schwächere Interaktion unter induzierenden Bedingungen mit Gal80 sowohl in hoher Kopienzahl als auch in niedriger Kopienzahl auf. Die Daten der Two-Hybrid-Analyse in der Überexpressions-Situation ergaben zumeist für die konstitutiven Mutanten einen ersten Hinweis auf einen möglichen Phänotyp. Da diese aber in niedriger Kopienzahl von Gal80 zumeist nicht bestätigt werden konnten, ist anzunehmen, dass der konstitutive Phänotyp relativ schwach ausgeprägt ist und nur durch die Überexpression beider Proteine verstärkt werden kann und dadurch erst erkennbar wird.

Anhand der neuen Mutanten die hauptsächlich in der C-terminalen Region lokalisiert sind und den bisher publizierten Mutanten, von denen einige in der N-terminalen Region liegen, kann man aufgrund der Daten in der Hefe *S. cerevisiae* schliessen, dass der N-Terminus und der C-Terminus für die beiden Funktionen von Gal1 von entscheidender Bedeutung sind.

4.2 Charakterisierung der *GAL1*-Mutationen in der Milchhefe *K. lactis*

Für die definitive Charakterisierung der im Two-Hybrid-System isolierten *gall*-Mutanten war es notwendig, sie auch *in vivo* in *K. lactis* bezüglich ihrer regulatorischen Eigenschaft und der Galaktokinase-Aktivität zu testen. Die Mutationen wurden durch CEN-Vektoren (1-2 Kopien pro Zelle) zunächst in den *GAL1*-Deletions-Stamm JA6D1R eingebracht und deren Fähigkeit zur Induktion des *LAC/GAL*-Regulons über die Expression der β -Galaktosidase (*LAC4*) ermittelt. Um auch hier einen direkten Vergleich zu den bereits charakterisierten *gall*-Mutanten zu erhalten, wurden diese auf die gleiche Weise mit gemessen. Mit diesen Komplementationstests in *K. lactis* konnte gezeigt werden, dass die Phänotypen in beiden Hefen nicht immer gleich waren. Am Beispiel der Mutanten *gall-m1* und *gall-m2* wurde dies bereits gezeigt (Vollenbroich *et al.*, 1999). Diese beiden Mutanten wurden in *K. lactis* als regulatorisch defekt, mit einer intakten Galaktokinase-Aktivität identifiziert. Die Two-Hybrid-Daten in *S. cerevisiae* zeigten eine Interaktion mit Gal80. Dies bedeutet, dass die im Two-Hybrid-System gemessene Interaktion nicht immer mit einer Induktion durch eine Interaktion mit Gal80 in *K. lactis* gleichzusetzen ist. Das Two-Hybrid-System hat sich, insbesondere bei Überexpression beider Proteine, als sehr sensitiv erwiesen. Die gemessenen Aktivitäten der β -Galaktosidase konnten ausschliesslich auf die Interaktion von Gal1 und Gal80 bezogen werden, da andere Proteine hier keine Rolle spielten. In *K. lactis* hingegen konnte das Induktionsvermögen der mutierten *GAL1*-Allele nur im Komplex mit Gal80 und Gal4 auf dem *GAL*-Promotor *in vivo* gemessen werden. Hierbei kommen noch eine Vielzahl weiterer Faktoren hinzu die an den *GAL*-Promotor binden können und das Induktionsvermögen der mutierten *GAL1*-Allele weiter beeinflussen. Daher kann es zu unterschiedlichen Resultaten kommen, da nicht ausschließlich die Interaktion von Gal1 mit Gal80 in *K. lactis* gemessen wird.

Da die mutierten Allele *gall-m1*, *gall-m2* (regulatorisch defekt) und *gall-209* (Kinase-defekt) in *K. lactis* isoliert wurden (Riley und Dickson, 1984; Meyer *et al.*, 1991; Vollenbroich *et al.*, 1999), dienten sie somit als Kontrolle für den Einsatz der CEN-Vektoren in *K. lactis*. Im CEN-Vektor zeigten die Mutanten *gall-m1* und *gall-m2* den erwarteten regulatorisch defekten Phänotyp. Das Allel *gall-m1* hatte, wie schon bei

Vollenbroich *et al.* (1999) gezeigt, einen etwas stärkeren Phänotyp als *gall-m2*. Die im Two-Hybrid-System isolierten Interaktionsmutanten *gall-22* und *gall-HY* sowie *gall-14* und *gall-18* (Menezes, pers. Mitteilung) zeigten in *K. lactis* wie *gall-m1* eine stark reduzierte Induktionsaktivität. Die Daten der Mutanten *gall-37* und *gall-40* entsprachen hingegen eher dem schwachen regulatorischen Defekt der Mutante *gall-m2*. Die Mutante *gall-42*, die im Two-Hybrid-System als regulatorisch defekt identifiziert wurde, zeigte eine um den Faktor 2 höhere Aktivität als *gall-m2* und eine um den Faktor 8 höhere als *gall-m1*. Aber auch hier kann man noch von einem Regulationsdefekt sprechen, da die Aktivität noch immer um den Faktor 5 zur Wildtyp-Aktivität erniedrigt ist.

Die konstitutiven Mutanten zeigten bei Überexpression in der Two-Hybrid-Analyse in Anwesenheit von Glukose eine Interaktion mit Gal80. In *K. lactis* hingegen konnte in Anwesenheit von Glucose keine Induktion gemessen werden. Die Glukose-Repression in *K. lactis* ist dominant gegenüber dem Induktionsvermögen der konstitutiven *Gall*-Allele (Vollenbroich *et al.*, 1999). Erst als Glukose durch Glycerin/Laktat ersetzt wurde, konnte der konstitutive Phänotyp der Mutanten *gall-1C*, *gall-2C* und *gall-4C* verdeutlicht werden. Hier konnte explizit gezeigt werden, dass die *in vivo*-Situation in *K. lactis* komplexere Wechselwirkungen beinhaltet, als dies in dem Two-Hybrid-System der Fall war.

Vergleicht man das Induktionsvermögen der mutierten Proteine mit dem Wachstumsverhalten auf Galaktose im Stamm JA6D1R (Δ *gall*), beobachtet man desweiteren, dass der Defekt in der regulatorischen Funktion einiger Mutanten nicht ausreichend ist, um das Wachstum auf Galaktose zu inhibieren. Die Mutanten *gall-22*, *gall-40*, *gall-HY* und *gall-42* sind in der Lage, die *GAL1*-Deletion in JA6D1R zu komplementieren. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da die weiteren regulatorisch defekten Mutanten *gall-m1*, *gall-m2*, *gall-14*, *gall-18* und *gall-37* dies nicht tun. Offensichtlich ist auch hier der Two-Hybrid-Test sensitiver gewesen. Die verbleibende Induktionsaktivität scheint hier ausreichend zu sein, um ein Wachstum in *K. lactis* zu ermöglichen. Das Allel *gall-HY*, das einen Interaktionsdefekt zeigte, aber Wachstum eines Δ *gall*-Stammes auf Galaktose ermöglicht, zeigte keine Komplementation von *gall-209*. Die Anwesenheit von *gall-209* zusammen mit *gall-HY* scheint ein Wachstum auf Galaktose zu inhibieren. Die jeweiligen Defekte beider Proteine sind dominierend gegenüber den intakten Funktionen. Die Phänotypen der Allele *gall-22* und *gall-40* hingegen konnten in *K. lactis* bestätigt werden. Wie in *S. cerevisiae* konnten sie als regulatorisch defekt und Kinase aktiv charakterisiert werden. Aufgrund des Kinasetests kann auch die Mutante *gall-37* in diese Gruppe eingeteilt werden. Der Kinase defekt in *S. cerevisiae* konnte in *K. lactis* nicht gezeigt werden. Die Mutante *gall-37* komplementierte den Kinase-defekt des Stammes 22A295-1. Der Stamm 22A295-1 hat eine Kopie des Kinase-defekten Allels *gall-209* im Genom (Meyer *et al.*, 1991). Offensichtlich kann das *gall-209* Allel durch die Allele *gall-37* und *gall-42*, die in *S. cerevisiae* keine Kinase-Aktivität zeigen, komplementiert werden. Die Mutation der *gall-BB* hat sich in *K. lactis* als stille Mutation erwiesen. Es konnte eine Galaktose-abhängige Induzierung gezeigt werden und zudem eine Komplementation der Kinase-Mutante *gall-209*. Die Komplementation in *K. lactis* hat gezeigt, dass man das Two-Hybrid-System als ersten Hinweis für die Isolation von Interaktionsmutanten verwenden kann. In mehreren Fällen zeigte sich dieser Test empfindlicher, als die Analyse der Regulationsfunktion von *Gall* in *K. lactis*.

In Tabelle 3.7 sind die Phänotypen der neuen *GAL1*-Allele in beiden Organismen dargestellt. Die Mutagenese von *GAL1* in der vorliegenden Arbeit resultierte somit in drei regulatorisch defekten Mutanten mit einer Kinase-Aktivität (*gall-22*, *gall-40* und *gall-37*), einer Nullmutante (*gall-HY*) und einer Mutante mit einer reduzierten Regulationsfunktion und einer intakten Galaktokinase-Aktivität (*gall-42*). Die genannten Mutationen befinden sich alle im C-terminalen Bereich. Zusammen mit den bisher publizierten Mutationen scheinen beide terminale Regionen an der Interaktion mit Gal80 beteiligt zu sein.

4.3 Mutationen von Gal1 geben Hinweise auf Interaktionsdomänen mit Gal80

Die umfangreiche Two-Hybrid-Analyse mit den *gal1*-Mutanten in *S. cerevisiae* und den Komplementationstest in *K. lactis* haben Hinweise auf bestimmte Bereiche als Interaktionsdomänen der Proteine Gal1 und Gal80 gegeben. Mit einer Two-Hybrid-Analyse der *gal1*-Mutanten mit verschiedenen Mutationen von Gal80 sollten die Interaktionsdomänen durch mögliche Supprimierung weiter charakterisiert werden. Die Mutanten *gal80-S0*, *gal80-S1*, *gal80-S2* (Nogi und Fukasawa, 1984; Zenke et al., 1999) und *gal80-R10* (Menezes, pers. Mitteilung) liegen in dem Bereich 302-367 und haben einen direkten Einfluss auf die Interaktion mit Gal1 und Gal4. Diese Mutationen liegen mitten in dem Bereich, der mit den Deletionen von Gal80 als mögliche Interaktionsdomäne identifiziert werden konnte (Nogi und Fukasawa, 1984; Zenke et al., 1999, Timson et al., 2002). Die Mutante *gal80-S1* zeigte eine reduzierte Affinität zum Wildtyp-Protein Gal1 und den konstitutiven *gal1*-Mutanten. Im Gegensatz dazu konnten die Mutanten *gal80-S0* und *gal80-S2* nicht mehr mit Gal1 in Wechselwirkung treten. Keine der mutierten *gal1*-Derivate konnte diesen Defekt supprimieren. Jedoch wurde von R. Menezes (pers. Mitteilung) eine Mutation von *GAL80* generiert (*gal80-R10*), die in der Lage war, den Regulationsdefekt der Mutanten *gal1-14* (W114R) und *gal1-18* (D108R) zu supprimieren. Überraschenderweise liegt diese Mutation in direkter Nachbarschaft zur Mutation der *gal80-S2*, die nicht mehr mit Gal1 interagieren kann. Desweiteren weisen auch hier die konstitutiven Mutanten eine erhöhte Affinität zu *gal80-R10* auf; *gal1-2C* (G286F) um den Faktor 3. Eine weitere Mutation in unmittelbarer Nähe an Position 261 (*gal1-209*) zeigt auch eine stark erhöhte Affinität zur Mutante *gal80-R10*. Somit kann bestätigt werden, dass der Bereich des C-Terminus in der Region 261-286 und der N-Terminus in der Region 108 und 114 an einer Interaktion mit der mittleren N-terminalen Domäne von Gal80 (302-367) beteiligt ist.

4.4 Protease-Verdau zur Identifizierung der Interaktionsdomänen von Gal1 und Gal80

Die Interaktionsdomänen beider Proteine sollten mit Hilfe eines Protease-Schutz-Experimentes näher identifiziert werden. Die kovalente Verknüpfung beider Proteine kann bestimmte Bereiche vor einem Protease-Verdau schützen. Diese Bereiche können dann nach Auftrennung in einem SDS-Gel und einer massenspektroskopischen Analyse identifiziert werden.

Mittels *in vivo* Crosslinking mit Formaldehyd und *in vitro* Crosslinking nach Brown et al. (1995) wurden die Proteine LexAGal1 und VP16Gal80 sowohl im gesamten Zellextrakt des *S. cerevisiae*-Hefestammes CTY10-5d als auch in teilweise aufgereinigten Fraktionen kovalent miteinander verknüpft. Das Crosslinking *in vivo* erfolgte durch Zugabe einer 1%igen Formaldehydlösung ins Medium einer logarithmisch wachsenden Kultur eines Stammes, der das LexAGal1 und VP16Gal80 co-exprimiert. Mit dieser Methode konnten verschiedene Crosslinking-Produkte erhalten werden, die der Grösse nach etwa einem Komplex von je einem Molekül LexAGal1 und VP16Gal80 bzw. weiteren Produkten mit Multimeren von VP16Gal80 entsprechen können. Die Identifizierung dieser Produkte, die lediglich über die Abschätzung der Komplexgrößen erfolgen konnte, war nicht möglich da sich diese innerhalb eines Proteinschmiere befanden. Die Ausbeuten waren zudem relativ gering. Für eine massenspektroskopische Analyse müssten die Produkte aus einem mit Coomassie angefärbten Gel isoliert werden. Die Proteinmengen lagen aber unterhalb der Nachweisgrenze für eine solche Färbemethode.

Zur Reduzierung des störenden Hintergrunds entschieden wir uns für das Crosslinking mit teilweise aufgereinigten Proteinfractionen von LexAGal1 und VP16Gal80. Da das Formaldehyd-Crosslinking hier nicht verwendet werden konnte, wurde die Methode nach Brown et al. (1995) angewendet. Diese Methode nutzt ein Tripeptid (GlyGlyHis),

das mit Nickel(II)-Ionen einen Komplex bildet und nach Aktivierung mit Monoperoxyphthalsäure (MMPP) ein oxidatives Crosslinking vermittelt. Alternative Methoden mit DTSP (Clontech) und SASE (ICN) waren weniger geeignet. Die Brown-Methode hat den Vorteil eines 0Å-Crosslinkers, der ganz spezifisch nur in Wechselwirkung tretende Proteine vernetzt. Das Fusionsprotein VP16Gal80 wurde dabei mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die VP16-Aktivierungsdomäne an die ProteinA gecoateten Latex-Beads immobilisiert. Antikörper haben eine natürliche Affinität zu ProteinA. Diese Latex-Beads wurden dann mit einem weiteren Zellextrakt der überexprimiertes LexAGal1 enthielt, inkubiert und anschliessend mit dem Tripeptid-Nickel(II)-Komplex versetzt. Ein parallel angesetzter Versuch zur Immobilisierung von LexAGal1 an die Latex-Beads schlug fehl aufgrund fehlender Affinität der LexA-Antikörper zu den Latex-Beads mit dem ProteinA. Wie schon zuvor mit Formaldehyd, konnte aber auch in diesem Experiment nach der Vernetzung nur ein Proteinschmier beobachtet werden mit einzelnen schwachen Banden spezifischer Crosslinking-Produkte. Diese Banden geben Hinweise auf die Bildung von Multimeren von Gal1 und Gal80, waren aber auch hier für eine weitere Analyse nicht geeignet. Melcher und Xu (2001) konnten bereits zeigen, dass Multimere von Gal80 und Gal4 physiologisch relevant sind zur effizienten *GAL*-Gen-Repression. Zudem konnten Timson *et al.* (2002) zeigen, dass Gal3 und Gal80 zur Komplexbildung in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 stehen, welches eine Bindung von zwei Molekülen, Gal1 mit einem Dimer von Gal80, wahrscheinlich macht. In Two-Hybrid-Analysen konnten jedoch keine Gal1-Dimere beobachtet werden (Vollenbroich, 1998).

Im nächsten Ansatz wurde ein Protease-Verdau ohne Crosslinking durchgeführt. In Anwesenheit von Galaktose und ATP wurden mit Nickel-NTA-Agarose hoch aufgereinigte His-getaggte Protein-Fractionen von Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* miteinander inkubiert. Dabei sollten relativ viele Gal1/Gal80-Komplexe gebildet werden, um sie dann mit α -Chymotrypsin zu verdauen. Ein vergleichbares Experiment wurde auch von Timson *et al.* (2002) mit aufgereinigten Fractionen von Gal3 und Gal80 aus *S. cerevisiae* durchgeführt.

Sie beobachteten dabei, dass gewisse Bereiche durch Interaktion beider Proteine geschützt werden. Diese geschützten Bereiche wurden anhand einer geringeren Intensität bestimmter Banden identifiziert. So konnte ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 36 kD identifiziert werden, welches den N-terminalen Bereich von Gal80 enthielt. Ferner wurde ein weiteres Gal80-Fragment von 12 kD gefunden, welches den Bereich um die Aminosäure 331 beinhaltete. Timson *et al.* (2002) schlossen daraus, dass der Bereich um die Aminosäure 331 durch eine Interaktion geschützt würde. Diese Daten decken sich auch mit der bereits über die Mutagenese von Gal80 gefundenen Region zwischen den Aminosäuren 302-367.

Ich konnte keine Abnahme der Intensität einer bestimmten Bande unter den gleichen Bedingungen beobachten. Lediglich wurde die Akkumulierung einzelner Banden in Abhängigkeit der Anwesenheit aller Co-Faktoren mit Molekulargewichten von 36 kD, 25 kD, 22 kD, 19 kD und 12 kD beobachtet. Die 25 kD- und der 22 kD-Banden waren allerdings in Abwesenheit von ATP auch deutlich reduziert. Die 36 kD- und die 12 kD-Banden könnten aufgrund der Homologie der Gal80-Proteine aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* identisch sein mit denen, die Timson *et al.* (2002) als geschützte Bereiche gefunden haben. Ich konnte jedoch keine Abnahme der Banden-Intensität dieser Fragmente beobachten. In Anwesenheit von Galaktose und ATP werden diese Fragmente akkumuliert. Alle Fragmente, mit Ausnahme des 22 kD-Fragmentes, sind spezifische Abbauprodukte von Gal80, die in Abwesenheit von Gal1 nahezu verdaut werden. Es scheint also eine Gal1-abhängige Wechselwirkung zu sein und spricht daher auch für weitere mögliche Bereiche, die mit Gal1 assoziiert sein können.

Die Abnahme mancher Fragmente (22 kD und 25 kD) in Abwesenheit von ATP und deren Akkumulierung in Anwesenheit aller Faktoren legt nahe, dass diese Fragmente in Abhängigkeit von ATP in Wechselwirkung treten können und dadurch gegen einen Protease-Verdau geschützt werden. Das 25 kD-Fragment ist ein spezifisches Abbauprodukt von Gal80 und das 22 kD-Fragment eines von Gal1. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit wurden bisher keine weiteren Analysen dieser Fragmente gemacht. In den Experimenten von Timson *et al.* (2002) konnte lediglich der

Schutz von Gal80-Fragmenten beobachtet werden, aber keine von Gal3. Dies ist unerwartet, da Bereiche beider Proteine involviert sein sollten. In unserem Experiment wurden mehr geschützte Fragmente von Gal80 und auch einige von Gal1 identifiziert. Für die Wechselwirkung der Proteine Gal1 und Gal80 aus *K. lactis* kann festgehalten werden, dass für das Protein Gal80 der Bereich um die Aminosäure 331, analog zu Gal80 aus *S. cerevisiae*, als mögliche Interaktionsdomäne oder Dimerisierungs-Domäne in Frage kommt. Für Gal1 konnte ein Bereich um die ATP-Bindestelle als mögliche Region für eine Wechselwirkung mit Gal80 in Abhängigkeit von ATP gezeigt werden. Die Sequenzierung dieser Fragmente steht allerdings noch aus.

4.5 Kristallisierung von Gal1 und Gal80 aus *K. lactis*

Die vorhergehenden Ergebnisse konnten einen Einblick in die Interaktionsbereiche der Proteine Gal1 und Gal80 vermitteln. Um den Einblick weiter zu vertiefen, sollten mit Hilfe der Kristallisation die dreidimensionalen Strukturen von Gal1 und Gal80 als Monomere und im Komplex dargestellt werden. Zur Herstellung für die Kristallisation ausreichender Mengen an Gal1 und Gal80 wurden die Proteine in hoher Kopienzahl in *K. lactis* exprimiert. Für die Aufreinigung der Proteine wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt die IMAC-Methode mittels Nickel-NTA-Agrose und 6xHis-getagtem Gal1 und Gal80 verwendet (Engels, 1999 und Zenke, 1995). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde eine Anionenaustauscher-Säule verwendet auf der Basis der Affi-Gel-Blue-Matrix, analog zur Aufreinigung der Phosphofruktokinase aus *S. cerevisiae* von Kopperschläger und Johansson (1982). Mit dem zweiten Reinigungsschritt konnte zum einen in der 6xHisGal80 Präparation die Kontamination des Adh1-Proteins aus der Lösung entfernt werden, und zum anderen konnte verhindert werden, dass das Gal1 während der Kristallisationsansätze sofort präzipitierte. Mit einer Ausbeute von 2-4 mg Gal1 bzw. 1,5-3 mg Gal80 reinem Protein pro Präparation, konnten ausreichende Mengen für die Kristallisationsversuche isoliert werden. R. Engels und J. Labahn hatten zunächst im „hanging-drop“-Verfahren mit dem Crystal Screen I und II Kristallisations-Bedingungen für Gal1 gefunden und diese weiter optimiert. So konnten erste Kristalle gebildet werden, die auch vermessen werden konnten. Sie lieferten auch die ersten Datensätze bei einer Auflösung von 3Å, die zwar relativ gering war, aber als Grundlage für ein Homologie-Modelling dienten. Um die Auflösung zu erhöhen, mussten bessere Kristalle herangezogen werden. Leider konnten die zuvor optimierten Bedingungen nicht mehr reproduziert werden, so dass entschieden wurde, in Zusammenarbeit mit S. Stork an der FU-Berlin einen neuen Screen zu generieren. Dabei wurden sowohl die Puffer des Crystal Screens I und II und des Index Screens mit weiteren 96 Puffer-Bedingungen angewandt. Durch Hinzugabe von 25% Glycerin im Aufbewahrungspuffer von Gal1 konnte das Protein für einen längeren Zeitraum stabilisiert werden. Mit dem Index Screen 53 und 81 wurden die besten Resultate bei 18°C und 4°C erzielt. Alle Kristalle waren aber bisher für eine Vermessung ungeeignet, da sie zum Teil aus dem Präzipitat gewachsen oder zu klein waren.

Versuche, Kristallisationsbedingungen für Gal80 zu finden, erbrachten bisher keinerlei Ergebnisse. Schwer zu kristallisierende Proteine bilden manchmal im Komplex eine homogenere Lösung und kristallisieren dann besser. Dies Phänomen konnten wir auch bei Gal80 und Gal1 in Gegenwart von 2 mM Galaktose und 2 mM AMPNPP beobachten. Erste Kristalle erhielten wir bei Ansätzen mit 6xHisGal1 und 6xHisGal80 in einem stöchiometrischem Verhältnis von 1:1. Die Kristallisierung im Komplex erfolgte auch im „hanging drop“-Verfahren und ergab im Puffer 6 des Crystal Screens I und 39, 46 und 47 des Crystal Screens II bei 4°C und 18°C die besten Resultate. Die Versuche zur Kristallisation von Gal1 und Gal80 im Komplex stehen allerdings noch am Anfang. Weiter optimierte Bedingungen führten schon zu transienten Kristallen, die aber bisher noch nicht reproduziert werden konnten.

4.6 Homologie-Modelling von Gal1 aus *K. lactis*

Im weiteren sollte untersucht werden, ob die Struktur von Gal1 ähnlich den bereits gelösten Strukturen der GHMP-Proteine sein könnte. Dazu wurde ein automatisches Homologie-Modelling mit dem internetbasierenden Programm MODBASE[®] (Pieper *et al.*, 2002) benutzt, mit dem man annotierte Proteinstrukturen in verschiedenen Datenbanken mit Proteinsequenzen vergleichen kann. In diesem Screen konnten die HSK und die MVK als Matrize für ein Modell von Gal1 und auch für Gal3 gefunden werden. Die Strukturen der PMK und der MDD wurden mit diesen Programmen nicht erfasst. In einem umgekehrten Screen mit der HSK konnten diese Strukturen auch nicht gefunden werden, was bedeutete, dass die Strukturen der PMK und MDD in diesen Datenbanken von den Programmierern nicht annotiert wurden. Daher haben wir zusätzlich die Sekundärstrukturen, der bereits als Matrize verwendeten MVK und der nicht erfassten MDD mit der Sekundärstruktur der Galaktokinase Gal1 aus *K. lactis* verglichen. Überraschenderweise war die Homologie der Struktur motive der MDD mit Gal1 höher als die mit der MVK. Somit war zumindest davon auszugehen, dass die beiden anderen Proteine, die nicht als Matrize für ein automatisches Homologie-Modelling gefunden wurden, dennoch für ein mögliches Struktur-Modell für Gal1 herangezogen werden konnten. So wurde erstmals gezeigt, dass eine mögliche Struktur von Gal1, auch topologisch konserviert war. Um dies weiterhin begründen zu können, wurde ein Homologie-Modelling durchgeführt, basierend auf Ergebnissen, die mit dem „3D jigsaw Comparative Modelling Server“ und dem „Swiss Modelling Server (ProDomII)“ erzielt wurden (J.Labahn, pers. Mitteilung). Dabei war das automatische Modelling der N-terminalen Domäne (AS 41-228) erfolgreich. Ein automatisches Modelling mit dem Rest des Proteins konnte aufgrund der zu geringen lokalen Homologie nicht durchgeführt werden. Mit Hilfe der MVK konnte jedoch eine Struktur für die Aminosäuren 229-248 und 336-503 identifiziert werden. Der fehlende Bereich der Aminosäuren 248-335 konnte durch dieses Modelling nicht erfasst werden. Erst durch den Vergleich der Sekundärstrukturen wurde ersichtlich, dass diese Region mit derjenigen der MDD vergleichbar ist und somit hauptsächlich helikale Strukturen aufweist. Das ermittelte Homologie-Modell für Gal1 beinhaltete ohne diesen Vergleich 374 von 503 Aminosäuren. Für die Positionierung mit empr (C.R. Kissinger, D.K. Gehlhaar and B.A. Smith, Agouron Pharmaceuticals, Inc) für einen evolutionären Suchalgorithmus wurden die unstrukturierten Bereiche (Loops) entfernt und die Struktur somit auf 301 Aminosäuren reduziert. Durch Hinzunahme des Datensatzes, der bereits vermessenen Kristalle von Gal1 (Auflösung 3Å) konnte ein Modell mit einem Korrelationsfaktor von 0,46 bestimmt werden und gezeigt werden, dass die Galaktokinase Gal1 tatsächlich eine Topologie, ähnlich derjenigen der GHMP-Gruppe, aufweist (Abbildung 3.17).

Mit diesem Modelling ist es gelungen, erstmalig eine Struktur der Galaktokinase Gal1 aufzuzeigen. Die Proteinstruktur weist wie bei allen anderen GHMP-Strukturen eine grosse, tiefe Kluft auf, in der das aktive Zentrum um den P-loop herum lokalisiert ist. Die Kluft wird jeweils durch eine N-terminale Domäne (obere Lippe) und eine C-terminale Domäne (untere Lippe) umschlossen. Analog zur HSK können die obere Lippe und untere Lippe die Substrate durch Ausbildung einer Salzbrücke umschliessen und so dem äusseren Milieu entziehen (Krishna *et al.*, 2001). Eine solche Konformationsänderung bewirkt, dass die Substrate in räumliche Nähe gelangen und ein nucleophiler Angriff möglich wird, bei dem ein Phosphat auf das Substrat übertragen wird. Eine solche Schließung eines Spaltes wird auch als “induced fit”, als eine induzierte Anpassung bei der Enzym-Substrat-Wechselwirkung bezeichnet.

Die genaue Kartierung der bisher generierten *GAL1*- und *GAL3*-Mutanten zeigte interessanterweise, dass die meisten der Mutanten diesen Schließmechanismus beeinflussen können oder erst durch die Schließung des Spaltes zusammengeführt werden und so eine funktionelle Domäne bilden. So liegen die meisten der konstitutiven Mutanten tief in der Kluft oder im Rückgrat des aktiven Zentrums und können die Konformationsänderung direkt beeinflussen (Abbildung 3.22, Abschnitt 3.8.2). Die Gruppe von Mutanten, die regulationsdefekt sind, aber noch Galaktose umsetzen können, sind in der oberen und unteren Lippe lokalisiert. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen, liegen diese Mutanten nicht nur direkt an der Oberfläche, sie sind auch auf einer

gleichen Seite gelegen und können nach Schließung des Spaltes zusammen kommen und so eine mögliche Interaktionsdomäne mit Gal80 bilden. Weiterhin liegt in dieser Region auch die Mutante *gal1-209*. Die Mutante *gal1-209* ist regulatorisch aktiv, aber Kinase-inaktiv. Sie ist in der α -Helix der unteren Lippe direkt vor dem aktiven Zentrum lokalisiert (Abbildung 3.21) und zeigte eine stark erhöhte Affinität zur Mutante *gal80-R10*. Zusammenfassend können somit zwei Interaktionsbereiche festgelegt werden, die an einer Wechselwirkung mit Gal80 beteiligt sind: in der oberen Lippe die Region der Aminosäuren 94-118 und in der unteren Lippe die Region von Aminosäure 254-261.

Ein weiterer wichtiger Bereich in der Struktur des Gal1 scheint der sogenannte Fuß dieses Moleküls in der C-terminalen Region zu sein (Abbildung 3.20). Dieser Fuss liegt direkt unterhalb des aktiven Zentrums, das durch den Schliessmechanismus der oberen und unteren Lippe eine stark flexible Region darstellt. Mutationen in diesem Bereich führten meistens, entsprechend den Ergebnissen des Two-Hybrid-Systems, zu einem kompletten Interaktionsverlust, der auch in *K. lactis* nachgewiesen werden konnte. Der Bereich zeichnet sich durch eine besondere Anordnung von drei β -Faltblättern mit jeweils zwei flankierenden α -Helices aus und scheint für die Stabilität des Proteins wichtig zu sein. Sowohl die β -Faltblätter, die antiparallel angeordnet sind, als auch die α -Helices gehen sehr wahrscheinlich intramolekulare Wechselwirkungen miteinander ein und stabilisieren so die strukturelle Integrität des Proteins.

Eine zweite stabilisierende Region findet man am N-Terminus, direkt im β -Faltblatt und in der α -Helix des P-loops (Abbildung 3.23). Durch verschiedene elektrostatische Wechselwirkungen mit der angrenzenden α -Helix (AS 114-133) wird dieser Bereich stabilisiert. In dieser Region sind verschiedene aromatische Aminosäuren lokalisiert (Trp114, Tyr117, Phe118 und Phe162), die sich mit ihren delokalisierten π - \bar{e} überlappen können. Mutationen in diesem Bereich beeinflussen die Substrat-Bindung und die regulatorische Funktion. So führt ein Austausch der Aminosäure Trp114 nach Arg zu einem Regulationsdefekt, ein Austausch des Phe162 nach Ser zu einem Verlust der Kinase-Aktivität (Daten nicht gezeigt; Menezes, pers. Mitteilung) und ein Austausch des Val146 zum aromatischen Phe zu einem kompletten Funktionsverlust. In unmittelbarer Nähe zur Aminosäure 162, die nach Austausch zu einem Verlust der Kinase-Aktivität führt, findet man an Position 164 ein Cystein, welches mit einem weiteren Cystein an Position 225 eines direkt angrenzenden β -Faltblattes eine Schwefelbrücke ausbilden kann. Somit kann die Anordnung des P-loops zusammen mit den zuvor beschriebenen aromatischen Aminosäuren von zwei Seiten her in dieser Position stabilisiert werden (Abbildung 3.23).

4.7 Homologie-Modelling von Gal80 aus *K. lactis*

Nachdem nun wichtige Bereiche von Gal1 bezüglich der Stabilisierung, aber hauptsächlich der Interaktion mit Gal80 identifiziert werden konnten, sollte nun auch eine mögliche Struktur von Gal80 die Bereiche aufzeigen, die an einer Interaktion mit Gal1 involviert sind. Da bereits verschiedene *gal80*-Mutationen gibt, wäre es interessant zu sehen, wo diese in einer 3D-Struktur lokalisiert wären. Parallel zur Strukturaufklärung von Gal1 versuchten wir auch über MODBASE[®] eine geeignete Struktur für Gal80 zu ermitteln. Da es für die Proteine Gal80 aus *K. lactis* und Gal80 aus *S. cerevisiae* nahezu keine homologen Moleküle mit einer vergleichbaren Funktion bekannt sind, dachten wir zunächst, dass wir ohne die Kristallstruktur kein automatisches Homologie-Modelling machen könnten. Überraschenderweise konnte mit MODBASE[®] eine Struktur gefunden werden, die eine höchst mögliche Korrelation von 1 aufwies (Abbildung 3.24). Es handelt sich dabei um die Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis*. Bei der GFOR aus *Z. mobilis* handelt es sich um ein periplasmatisches Enzym, welches durch die gekoppelte Reaktion einer Reduktion von Fruktose und einer Oxidation von Glukose, Sorbitol und Gluconolacton bildet und so das Bakterium vor osmotischem Schock schützen kann. GFOR bildet wie Gal80 multimer Komplexe, die physiologisch relevant sind (Abbildung 3.27). Durch die Multimerisierung kann eine klassische Dinucleotid-Bindedomäne ausgebildet

werden, die NADP als Co-Faktor binden kann (Kingston *et al.*, 1996). Die Funktion der GFOR unterscheidet sich erheblich von dem transkriptionellen Repressor Gal80. Daher stellte sich die Frage nach der Relevanz der über das Homologie-Modelling gefundenen Struktur. Um diese Frage zu klären, wurde ein Protein-Alignment von Gal80 aus *K. lactis*, Gal80 aus *S. cerevisiae* und GFOR aus *Z. mobilis* gemacht und zudem die Sekundärstrukturen verglichen. Daraus ergab sich, dass Gal80 und die GFOR sich nur im N-Terminus wesentlich unterscheiden. Am N-Terminus der GFOR befindet sich zum einen über eine Länge von 51 Aminosäuren ein Bereich, der für die Lokalisierung der GFOR im Periplasma verantwortlich ist, und zum anderen ein langer unstrukturierter Bereich, der als eine Art Arm einen ternären Komplex der GFOR stabilisiert (Kingston *et al.*, 1996). Diese beiden Funktionen des N-Terminus der GFOR, sind bei Gal80 wahrscheinlich nicht vorhanden. Ab der Aminosäure 115, kann man nahezu identische Struktur motive bei beiden Proteinen beobachten. Die Struktur der GFOR wurde daher als Strukturmodell für Gal80 angewandt. In den Abbildungen 3.26 und 3.27 sind verschiedene Formen der GFOR-Struktur aufgezeigt. Die GFOR kann über ein Motiv von neun antiparallel zueinander angeordneten β -Faltblätter, zwei verschiedene multimere Formen annehmen. Diese Domäne bildet eine Art Interface für Proteininteraktion innerhalb eines Komplexes (Kingston *et al.*, 1996). Diese Interaktion kann „face to face“ sein (Form I), so dass die neun β -Faltblätter direkt aufeinander liegen (Abbildung 3.27 A), oder sie kann um 180° verdreht sein (Form II), so dass sie aufeinander folgen und ein Interface mit 18 β -Faltblättern bilden (Abbildung 3.27 B). Beide Formen zusammengenommen bilden eine stabile ternäre-Struktur (Kingston *et al.*, 1996). Eine Kartierung der bekannten Mutationen von Gal80 verdeutlichte, dass sie bei jeder Form der Dimerisierung in unmittelbarer Nähe der Dimerisierungsdomänen lokalisiert sind. Es ist somit auch nicht auszuschließen, dass die Phänotypen dieser Mutationen in Bezug auf ihre Interaktionen mit Gal4 zum Teil durch ein verändertes Verhalten der Dimerisierung bedingt sein können. Melcher und Xu (2001) konnten zeigen, dass eine Dimerisierung von Gal80 den Komplex Gal80/Gal4/DNA stabilisiert und nur so eine effiziente Repression, vermittelt durch Gal80, stattfinden kann. Ein interessanter Aspekt wäre in diesem Zusammenhang, dass Gal1 mit Gal80, während der Interaktion mit Gal4 in Wechselwirkung treten und dadurch den stabilen Komplex von je zwei Molekülen, Gal80 und Gal4, destabilisiert. Unterstützt würde dies durch die Mutationen *gal80-S0* und *gal80-S2*, die zwar mit Gal4 in Wechselwirkung treten, aber nicht mehr mit Gal1 interagieren können. Diese könnten vielleicht sehr stabile Komplexe bilden, die die Repression verstärken und so die Interaktion mit Gal1 verhindern. Die Mutante *gal80-R10* weist einen Austausch auf, der die Affinität zu Gal1 erhöht, aber die Bindung mit Gal4 in *K. lactis* nicht beeinträchtigt (Menezes, pers. Mitteilung). Diese Mutation liegt direkt neben der Mutation *gal80-S2*, die nicht mehr mit Gal1 interagieren kann. Somit ist dies ein potentieller Bereich, der direkt mit Gal1 in Wechselwirkung tritt. Aufgrund dieser Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Struktur von Gal1 und einem möglichen Modell für Gal80 wurde folgendes Modell erstellt, welches vereinfacht die Interaktion von Gal1 und Gal80 darstellen soll (Abbildung 4.1). Nach Bindung der Substrate Galaktose und ATP in der Kluft kommt es im Gal1-Molekül zu einer erheblichen Konformationsänderung, bei der die obere und untere Lippe näher zusammenkommen. Dadurch kommen verschiedene Bereiche (94-118 und 261-286), die an einer Interaktion mit Gal80 beteiligt sind, zusammen. Maßgeblich zu diesem Modell beigetragen haben die Mutationen der oberen Lippe und der unteren Lippe. Die Galaktose-unabhängigen Interaktionen der konstitutiven Mutanten, die in der tiefen Kluft oder im Rückgrat des aktiven Zentrums lokalisiert sind, unterstützten einen solchen Mechanismus. Diese Mutationen könnten ein leichtes Abknicken der Struktur bewirken und so die Interaktionsflächen der oberen und unteren Lippe näher zueinander bringen und dadurch eine schwache Interaktion mit Gal80 ermöglichen. Diese Konformationsänderung wird in Anwesenheit von Galaktose und ATP zu Ende geführt, welches dann eine starke Interaktion mit Gal80 bewirkt. Aufgrund der Two-Hybrid- und der Struktur-Analysen kann man für Gal80 mindestens zwei direkte Interaktionsstellen, M366 (*gal80-R10*) und E367 (*gal80-S2*), mit Gal1 festlegen. Inwieweit die anderen *GAL80*-Mutationen Positionen darstellen, die an einer Interaktion beteiligt sind, darüber kann nur spekuliert werden.

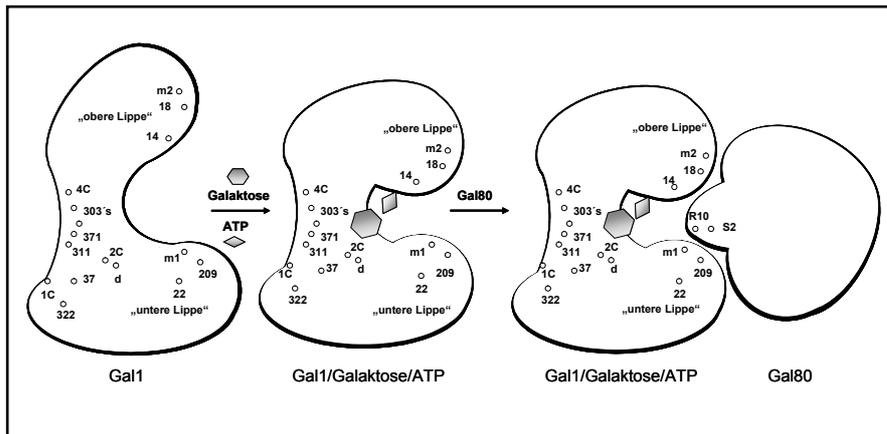


Abbildung 4.1
Vereinfachtes
Interaktionsmodell für die
Proteine Gal1 und Gal80
aus *K. lactis*.

4.8 Die Lokalisierung von Gal1 und Gal80 in *K. lactis* versus *S. cerevisiae*

Bisher konnte relativ eindeutig geklärt werden, über welche Bereiche die Proteine Gal1 und Gal80 miteinander in Wechselwirkung treten können. Unklar ist, wie die Wechselwirkung von Gal1 und Gal80 zu der Aktivierung des Gal4-Komplexes im Kern führt. Bisher wurde die Meinung vertreten, dass Gal1 bzw. Gal3 im Kern mit dem Gal80/Gal4-Komplex interagiert und eine Konformationsänderung bewirkt, die eine Induzierung der *GAL*-Gene ermöglicht (Leuther und Johnson, 1992). Platt und Reece (1998) konnten *in vitro* einen trimeren Komplex von Gal3, Gal80 und Gal4 nachweisen. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, eine Lokalisierung von Gal1 oder Gal3 im Kern nachzuweisen. Gal1 und Gal3 scheinen hauptsächlich im Cytoplasma vorzuliegen. Im Gegensatz dazu konnte Gal80 im Cytoplasma und im Kern nachgewiesen werden (Peng und Hopper, 2002). Dies stützt die Annahme, dass auf jeden Fall eine Wechselwirkung von Gal1 bzw. Gal3 mit Gal80 im Cytoplasma stattfindet. Peng und Hopper (2002) konnten zudem in *S. cerevisiae* zeigen, dass eine Dereprimierung auch vermittelt werden kann, wenn man Gal3 mit der Zell-Membran assoziiert und dadurch eine Kernlokalisierung verhindert. Mit diesem Experiment konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen von Gal3 dennoch in den Kern gelangten und dort die Wechselwirkung von Gal80 und Gal4 beeinflussten. In diesem Zusammenhang könnte man den im vorangegangenen Abschnitt erwähnten Aspekt aufgreifen, dass Gal1 an $(Gal80/Gal4)_2$ bindet, die Dimerisierung von Gal80 aufhebt und so den Repressor-Aktivator-Komplex destabilisiert. Schon geringe Mengen an Gal1 im Kern wären ausreichend um eine Dereprimierung zu vermitteln. Durch Chromatin-Immun-Präzipitationsexperimente (CHIP) in *K. lactis* konnte gezeigt werden, dass Gal1 tatsächlich im Zellkern an einen Gal80/Gal4-Komplex auf der DNA bindet. CHIP-Experimente in *S. cerevisiae* mit Gal4, Gal80 und Gal3, durch Peng und Hopper (2002) zeigten schon zuvor, dass Gal4 immer an die UAS_{GAL} -Sequenz gebunden ist. Daran assoziiert kann man in Abwesenheit von Galaktose eine vergleichbare Menge an Gal80 nachweisen. Nach Zugabe von Galaktose beobachteten die Autoren eine Abnahme von gebundenem Gal80 um etwa 50%. Somit konnte zumindest bestätigt werden, dass wahrscheinlich die Dimerisierung von Gal80 in Anwesenheit von Galaktose, gelöst wird und so den *GAL*-Promotor verlässt. Überraschenderweise konnten sie kein im Kern gebundenes Gal3 nachweisen. Sie schlossen daraus, dass Gal3 während der Induktion nicht aktiv an der Auflösung des Gal80-Dimers beteiligt ist. Sollten geringe Mengen an Gal3 notwendig sein, um eine Dereprimierung zu vermitteln, müsste dies in den CHIP-Experimenten eindeutig gezeigt werden können. Mit dieser Methode werden Protein-bindende DNA-Sequenzen isoliert und mit PCR nachgewiesen. Schon geringe Mengen an DNA sind ausreichend, um ein deutliches Signal durch die PCR zu erhalten.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die erklären können, warum Peng und Hopper kein Gal3-Präzipitat nachweisen konnten. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Gal3 nicht im Kern involviert ist. Dies würde bedeuten, um das Galaktose Signal in den Zellkern zu

vermitteln, müsste eventuell ein weiteres Protein anwesend sein, das die Übermittlung übernimmt. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung (Hertveldt *et al.*, 2003) konnte zeigen, dass Gal80 unter anderem mit einer Ubiquitin-Ligase, Ubr1, interagieren kann. Für verschiedene Ubiquitin-Ligasen (PARC und Mdm2) konnte unter anderem gezeigt werden, dass sie bestimmte Proteine wie p53 binden können und sie so in bestimmte Zellkompartimente transportieren. (Nikolaev *et al.*, 2003). Übertragen auf Gal80 könnte die Ubiquitin-Ligase Ubr1 in Anwesenheit von Galaktose in den Kern translozieren und die Lokalisierung von Gal80 in Form eines Shuttle-Proteins insofern verändern, dass im Cytoplasma befindliches Gal3 dort Gal80 bindet, ohne selber in den Zellkern zu müssen. So könnte Ubr1 ein Galaktose-Signal in den Kern vermitteln. Für Mdm2 konnte gezeigt werden, dass es p53 aus dem Kern transportiert, welches dann im Cytoplasma durch PARC gebunden und zurückgehalten wird (Nikolaev *et al.*, 2003).

Zum anderen ergibt sich eine Möglichkeit aus dem CHIP-Experiment selber. Peng und Hopper haben die Zellen nach Anzucht in Glycerin und Lactat für 20 min mit Galaktose induziert. *S. cerevisiae* ist in der Lage, unter diesen Bedingungen innerhalb weniger Minuten die Induktion der *GAL*-Gene einzuleiten (Johnston, 1987). Daher wäre lediglich die Anwesenheit von Gal3 in den ersten Minuten im Kern erforderlich, um die Repression durch Gal80 aufzuheben. Es ist denkbar, dass nach 20 min Induktion die Dereprimierung durch Gal3 im Kern längst vorüber ist und daher Gal3 nicht mehr nachweisbar wäre. Das CHIP-Experiment von Peng und Hopper beschreibt ausschliesslich die Situation nach 20 min und gibt keine Informationen darüber, was zuvor im Kern passierte.

Ein interessanter Aspekt wäre eine eventuelle Kombination aus beiden genannten Möglichkeiten. Durch eine Interaktion von Ubr1 mit Gal80 unter induzierenden Bedingungen könnte zunächst Gal3-unabhängig der Gal80-Komplex destabilisiert werden. Daraufhin wird Gal80 aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert wo es von Gal3 gebunden werden kann. Anschliessend wären geringe Mengen von Gal3 im Kern ausreichend, um eine schnelle Dereprimierung durch die Bindung des verbleibenden Monomers von Gal80 vermitteln zu können. Weiterhin könnte aber auch durch das gebundene Gal80-Molekül im Kern eine schnelle Reprimierung in Anwesenheit von Glucose ermöglicht werden. Sollte dieser Mechanismus Ubr1-unabhängig sein, wäre eine Destabilisierung des Gal80-Dimers auch durch eine Verringerung der Gal80-Konzentration im Kern erdenklich. Durch die Bindung von Gal80 im Cytoplasma durch Gal3 würde Gal80 aus dem Kern titriert werden, und das könnte zur Folge haben, dass so der Komplex im Kern instabil und bei niedriger Gal80-Konzentration auseinander fallen würde.

Die von Peng und Hopper erhaltenen Daten mit der CHIP-Analyse unterscheiden sich unter induzierenden Bedingungen nur in einem wichtigen Punkt von denen, die in dieser Arbeit für die Hefe *K. lactis* ermittelt wurden. Die CHIP-Analyse wurde für *K. lactis* unter den gleichen Bedingungen nach einer 20 min Induzierung mit Galaktose durchgeführt. Im Gegensatz zur Hefe *S. cerevisiae* konnte in *K. lactis* Gal1 auf der UAS_{GAL} -Sequenz nachgewiesen werden. Die Menge des PCR-Produkts, präzipitiert mit α Gal1, war in etwa gleich mit der des α Gal80-Präzipitats, sowohl im Stamm JA6 als auch im Stamm KB6-2C. Somit konnte auch hier ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1, analog zu den Experimenten von Timson *et al.* (2002) in *S. cerevisiae*, gezeigt werden. Ein Vergleich des α Gal80-Präzipitats im Kern unter nicht induzierenden Bedingungen mit denen unter induzierenden, zeigte eindeutig einen Unterschied von etwa 50%, wie dies auch durch die CHIP-Analysen von Peng und Hopper für *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte. So konnte auch hier verdeutlicht werden, dass Gal80 in Anwesenheit von Galaktose den Promotor verlässt, aber noch immer ein Monomer über Gal4 an die DNA assoziiert, vorliegt. Im Gegensatz zu den Analysen in *S. cerevisiae* konnte in *K. lactis* nachgewiesen werden, dass Gal1 dieses Monomer bindet. Allerdings konnte auch in *K. lactis* mit Hilfe eines *GAL1*-Deletionsstammes gezeigt werden, dass eine mögliche Auflösung des Gal80-Komplexes unabhängig von Gal1 stattfindet, aber letztendlich zu keiner Derepression führt. Zum einen konnte dies mit der CHIP-Analyse verdeutlicht werden, da die Menge an α Gal80-Präzipitat auch ohne Gal1 in Anwesenheit von Galaktose um die Hälfte abnimmt, und zum anderen konnte in Wachstumstests gezeigt werden, dass dieser Stamm nicht auf Galaktose als einziger

Kohlenstoffquelle wachsen kann. Erst die Anwesenheit von Gal1, gebunden an einen Gal80/Gal4-Komplex, vermittelt eine Dereprimierung. Aufgrund dieser Daten kann angenommen werden, dass auch hier ein weiterer Faktor involviert sein kann, der ein Galaktose-Signal unabhängig von Gal1 in den Kern vermittelt, aber nicht in der Lage ist, eine Dereprimierung in *K. lactis* einzuleiten. Wahrscheinlich handelt es sich in *K. lactis* um den gleichen Mechanismus wie in *S. cerevisiae*. Der einzige Unterschied besteht darin, dass nach 20 min die Anwesenheit von Gal1 noch nachgewiesen werden kann. Die Dereprimierung scheint in *K. lactis* etwas langsamer zu verlaufen, als dies in *S. cerevisiae* der Fall ist. Analog zur Hefe *S. cerevisiae*, konnte auch in *K. lactis* eine Ubiquitin-Ligase (Ubr1) gefunden werden, die eventuell das Galaktose-Signal vermitteln kann. Es konnte aber bisher weder in *K. lactis* noch in *S. cerevisiae* experimentell ein Zusammenhang gezeigt werden.

Aufgrund dessen kann folgendes Modell erstellt werden (Abbildung 4.2). Unter reprimierenden Bedingungen sind sowohl Gal4 als auch Gal80 in Form von Dimeren zusammen an die DNA gebunden. Gal80 maskiert die Aktivierungsdomäne von Gal4 und verhindert eine *GAL*-Gen-Induktion. In Anwesenheit von Galaktose kann ein Gal1-unabhängiges Galaktose-Signal möglicherweise die Dimerisierung von Gal80 destabilisieren. In Anwesenheit von Gal1, Galaktose und ATP kann so eine Bindung im Komplex mit einem Monomer von Gal80 an der DNA vermittelt werden. So wird letztendlich eine Dereprimierung bzw. Induzierung der *GAL*-Gene eingeleitet. In *K. lactis* und auch in *S. cerevisiae* scheint dieser Mechanismus so oder so ähnlich abzulaufen, wobei für *S. cerevisiae* eine Kernlokalisierung von Gal3 zunächst noch gezeigt werden muss. Desweiteren ist die Funktion der Ubiquitin-Ligase Ubr1 noch nicht experimentell gezeigt worden. Bisher kann man nur eine Interaktion mit Gal80 nachweisen, die relevant sein könnte (Hertveldt *et al.*, 2003).

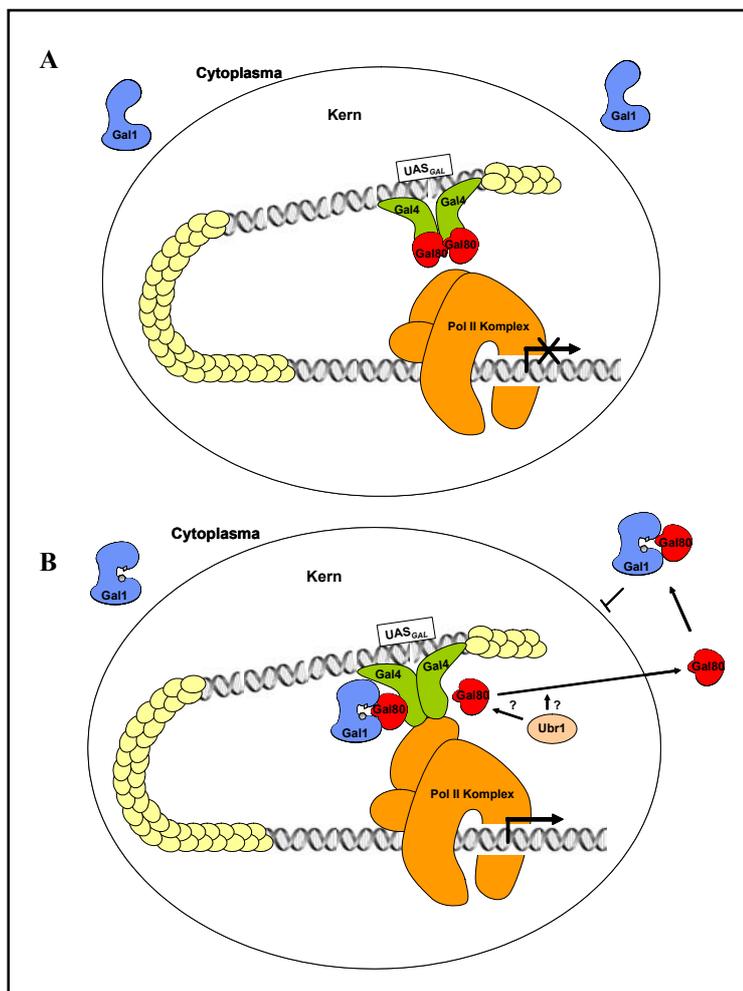


Abbildung 4.2
Interaktions-Modell für die Proteine Gal1, Gal80 und Gal4 in *K. lactis* und *S. cerevisiae*.
A: reprimierter Zustand
B: induzierter Zustand

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Wechselwirkung der Proteine Gal1 und Gal80 aus der Milchhefe *K. lactis* genauer zu charakterisieren und die Interaktionsdomänen zwischen den Proteinen Gal1 und Gal80 zu identifizieren. Gal1 ist gleichzeitig die Galaktokinase und das Induktorprotein, das nach Bindung von Galaktose und ATP den Repressor Gal80 inaktiviert.

Mit Hilfe der Two-Hybrid-Analyse in *S. cerevisiae* wurden nach Mutagenese von Gal1 neue Interaktionsmutanten mit Gal80 isoliert. Die mutierten Allele wurden sequenziert, analysiert und durch Komplementationstests in *K. lactis* untersucht. Fünf mutierte *GAL1*-Allele zeigten Austausch in der C-terminalen Region. Die Mutanten *gal1-22* und *gal1-40* zeigten keine Interaktion mit Gal80, konnten aber noch immer Galaktose phosphorylieren. Das Allel *gal1-HY* wies einen kompletten Funktionsverlust auf, während die Mutanten *gal1-37* und *gal1-42* nur einen Verlust bzw. eine Reduzierung der regulatorischen Funktion hatten. Die Analysen dieser und zuvor charakterisierten *gal1*-Mutanten im Two-Hybrid-System mit bereits publizierten *gal80*-Mutanten ergaben, dass nur Gal80-S1 mit dem Wildtyp Gal1 eine Interaktion aufwies, jedoch keine mit der regulatorisch defekten *gal1*-Mutanten. Eine Supprimierung eines Interaktionsdefekts im Two-Hybrid-System zeigte bisher nur die Mutante *gal80-R10* (M366V), und zwar mit der Mutante *gal1-18* (D108A; Menezes pers. Mitteilung). *Gal80-R10* zeigte weiter eine erhöhte Affinität zu Gal1 und einigen konstitutiven Mutanten.

In einem zweiten Ansatz wurden die Interaktionsdomänen der Proteine Gal1 und Gal80 durch Crosslinking-Experimente und Protease-Verdaue untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Gal80-Bereich um die Aminosäure 331 als mögliche Interaktionsdomäne oder Dimerisierungsdomäne in Frage kommt. Für Gal1 konnte ein Bereich um die ATP-Bindestelle als mögliche Region für eine Wechselwirkung mit Gal80 ermittelt werden.

Gal1 kann der Familie der GHMP-Proteine zugeordnet werden, von denen für einige Mitglieder bereits Kristallstrukturen vorliegen. Durch Homologie-Modelling auf Basis der publizierten Strukturen und unterstützt von einer 3 Å Struktur des Gal1 (in Zusammenarbeit mit Dr. J. Labahn, FZ-Jülich) wurde ein Strukturmodell für Gal1 entwickelt. Die Lokalisierung der Mutanten in diesem Modell ergeben Hinweise auf den Mechanismus der Galaktose- und ATP-abhängigen Interaktion zwischen Gal1 und Gal80. Die Aminosäurepositionen, die in den Interaktionsmutanten in den Bereichen 94-118 (obere Lippe) und 254-286 (untere Lippe) liegen, kommen nach Bindung von Galaktose und ATP näher zusammen und bilden eine Interaktionsdomäne. Mit Hilfe der konstitutiven *gal1*-Mutanten konnte u.a. die Konformationsänderung im Rückgrat des aktiven Zentrums aufgezeigt werden. Für Gal80 konnten mindestens zwei direkte Interaktionsstellen, M366 (*gal80-R10*) und E367 (*gal80-S2*), mit Gal1 festgelegt werden.

Durch Chromatin-Immun-Präzipitationsexperimente (CHIP) in *K. lactis* konnte erstmalig gezeigt werden, dass Gal1 unter induzierenden Bedingungen im Zellkern an einen Gal80/Gal4-Komplex auf der DNA bindet. Allerdings deuten die Daten der CHIP-Experimente auch auf eine Gal1-unabhängige Destabilisierung des Gal80/Gal4-Komplexes hin. Sie führt jedoch nicht zu einer Dereprimierung der *GAL*-Gene. Für eine Dereprimierung ist die Anwesenheit von Gal1 erforderlich. Die Existenz eines weiteren Faktors zur Weiterleitung des Galaktose-Signals bedarf weiterer Untersuchungen.

6. Literatur

1. **Adams, B.G., Dalbec, J.M., (1977):** Non-pleiotropic nature of the gal3-mutation in yeast. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **7**: 1348-1354
2. **Anderson, C.M., Zucker, F.H. Steitz, T.A. (1979):** Space filling models of kinase clefts and conformational changes. *Science* **204**: 375-380.
3. **Axelrod, J.D., Majors, J., Brandriss, M.C., (1991):** Proline-Independent Binding of *PUT3* Transcriptional Activator Protein Detected by Footprinting In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 564-567
4. **Bajwa, W., Torchia, T., Hopper, J.E., (1988):** Yeast regulatory gene *GAL3*: carbon regulation; UAS_{Gal} elements in common with *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL80*, and *MEL1*; encoded protein strikingly similar to yeast and *E. coli* galactokinases. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3439-3447
5. **Baleja, J.D., Marmorstein, R., Harrison, S.C. und Wagner, G. (1992):** Solution structure of DNA-binding domain of Cd₂-Gal4 from *S. cerevisiae*. *Nature* **356**: 450.
6. **Bianchi, M.M., Falcone, C., Jie, C.X., Wésolowski-Louvel, M., Frontali, L., Fukuhara, H., (1987):** Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 µm circular pKD1. *Curr. Genet.*, **12**: 185-192
7. **Blank, T.E., Woods, M.P., Lebo, C.M., Xin, P. & Hopper, J.E. (1997).** Novel gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2566-2575.
8. **Boles, E. und Hollenberg, C.P. (1997):** The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111
9. **Bonanno, J. B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M.J., Ilyin V., Gerchman, S.E., Kycia, H., Studier, F.W., Sali A., & Burley, S.K., (2001).** Structural Genomics of Enzymes Involved in Sterol/Isoprenoid Biosynthesis. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **98**, 12896-12901.
10. **Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. (1993).** Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* **2**, 31-40.
11. **Bradford, M.M. (1976).** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
12. **Breunig, K.D. and Kuger, P., (1987):** Functional homology between the yeast regulatory proteins *GAL4* and *LAC9*: *LAC9*-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the *GAL4* Protein-binding site. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4400-4406
13. **Breunig, K.D. (1989):** Galactose regulation of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator *LAC9*. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 422-427
14. **Brown, K.C., Yang, S.-H. und Kodadek, T. (1995):** Highly specific oxidative cross-linking of proteins mediated by a nickel-peptide complex. *Biochemistry* **34**: 4733-4739.
15. **Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., Guarente, L. (1988)** „Function of a yeast TATA element binding protein in a mammalian transcription system.“ *Nature* **334**, 37-42.
16. **Carey, M., Kakidani, H., Leatherwood, J., Mostashari, F., Ptashne, M., (1989):** An amino-terminal fragment of *GAL4* binds DNA as a dimer. *J. Mol. Biol.* **209**:423-32
17. **Carrozza, M. J., John, S., Sil, A., K., Hopper, J., E., Workman, J., L., (2002):** Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators *Biol Chem.* **277**(27):24646-52

18. **Celenza, J.L., Carlson, M., (1986):** A yeast gene that is essential for release from Glukose repression encodes a protein kinase. *Science*, **233**: 1175-1180
19. **Chang, Y.-D., and Dickson, R.C., (1988):** Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 16696-16703
20. **Chasman, D. and Kornberg, R.D., (1990):** GAL4 Protein: Purification, Association with GAL80 Protein and Conserved Domain Structure. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2916-2923
21. **Chen, W. and Struhl, K. (1985)** „Yeast m-RNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from TATA element.“ *EMBO J.* **4**, 3273-3279
22. **Combet, C., Blanchet C., Geourjon C. & Deléage G. (2000).** NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* **25**, No 3 [291]: 147-150.
23. **Cramer, P., Bushnell, D.A. und Kornberg, R.D. (2001):** Structural basis of transcription: RNA-polymerase II at 2,8 Å resolution. *Science* **298**: 1844-6.
24. **Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. und McPherson, A. (1994):** *Acta Cryst.* **D50**:414-423.
25. **Dickson, R.C., Sheetz, M. und Lacy, L.R. (1981):** Genetic regulation: Yeast mutants constitutive for β -Galactosidase activity have an increased level of β -Galactosidase messenger ribonucleic acid. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 1048-1056.
26. **Dickson, R.C., Barr, K. (1983)** Characterization of Lactose Transport in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **154**:1245-1251
27. **DeVit, M.J., Waddle, J.A., Johnston, M., (1997):** Regulated nuclear translocation of the Mig1 Glukose repressor. *Mol. Cell. Biol.* **17**(5):1603-18
28. **Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. & Hollenberg, C.P. (1991).** An efficient transformation procedure enabling long term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692.
29. **Douglas, H.C. & Hawthorne, D.C. (1966):** Enzymatic expression and genetic linkage of genes controlling galactose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **49**: 837-844.
30. **Douglas, H.C. & Hawthorne, D.C. (1972).** Uninducible mutants in the *gal* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **109**, 1139-1143.
31. **Engels, R., (1999):** Die Rolle der Galaktokinase beim Induktionsprozeß der *LAC/GAL*-Gene der Milchehefe *Kluyveromyces lactis*. Dissertation, Universität Düsseldorf
32. **Fields, S. und Song, O. (1989):** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
33. **Fink, G.R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983):** Methods in yeast genetics, laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York
34. **Georis, I., Cassart, J.P., Breunig, K.D., Vandehaute, J. (1999):** Glucose repression of *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KIINV1* does not require Mig1p. *Mol Gen. Genet.* **261**:862-870.
35. **Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M., (1985):** Specific DNA-binding of *GAL4*, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767-774
36. **Gödecke, A., Zachariae, W., Arvanitidis, A., Breunig, K.D., (1991):** Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -Galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kb divergent promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5351-5358
37. **Guarente, L., (1988):** UAS's and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell.* **52**:303-5
38. **Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997).** Swiss Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.

39. **Halverson, Y.-D.C., Nandabalan, K., Dickson, R.C., (1990):** LAC9 DNA-binding domain coordinates two zinc atoms per monomer and contacts DNA as a dimer. *J. Biol. Chem.* **264**:13283-289
40. **Hanahan, D. (1983):** Techniques for transformation of *E. coli* Glover, P.M. (Hrsg.) DNA cloning Vol.I. IRL Press Oxford
41. **Hertveldt K., Dechassa M.L., Robben J. and Voleckaert G. (2003):** Identification of Gal80p-interacting proteins by *Saccharomyces cerevisiae* whole genome phage display. *Gene* **307**:141-9
42. **Hinnebusch, A.G., (1984):** Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6442-6446
43. **Hirst, M., Kobor, M.S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., Sadowski, I., (1999):** *GAL4* is regulated by the RNA-Polymerase II holoenzyme-associated cyclin dependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol. Cell.* **3**(5):673-78
44. **Hope, I.A., Mahadevan, S. and Struhl, K., (1988):** Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast Gcn4 protein. *Nature* **333**: 635-640
45. **Igarashi, M., Segawa, T., Nogi, Y., Suzuki, Y. und Fukasawa, T. (1987):** Autogenous regulation of *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene *GAL80*. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 273-279.
46. **Inis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, J.T. (1990)** „PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press Inc.*
47. **Jancarik, J. und Kim, S.H. (1991)** *J. Appl. Cryst.* **24**: 409-411.
48. **Johnson, E.S., Bartel, L.B., Seufert, W. und Varshawsky, A. (1995):** Ubiquitin as a degradation signal. *EMBO J.* **11**, 497-505.
49. **Johnston, M & Carlson, M. (1992).** Regulation of Carbon and Phosphate Utilization. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* (Jones, E.W., Pringle J.R., & Broach, J. R., eds) Vol. II, pp. 193-281, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
50. **Johnston, M. (1987).** A Model of Gene Regulatory Mechanisms: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**, 458-476.
51. **Johnston, S.A., Salmeron, Jr., J.M. und Dincher, S.S. (1986):** Interaction of Positive and Negative Regulatory Proteins in the Galactose Regulon of Yeast. *Cell* **50**:143-146.
52. **Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M., (1986):** Separation of binding from the transcription activating function of an eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704
53. **Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A.D., (1992):** Ssn6-Tup1 Is a General Repressor of Transcription in Yeast *Cell* **68**: 709-719
54. **Kew, O.M., und Douglas, H.C. (1976):** Genetic co-regulation of galactose and melibiose utilization in *Sacharomyces*. *J. Bacteriol.* **125**: 33-41
55. **Kingston, R.L., Scopes, R.K. und Baker, E.N. (1996):** The structure of Glukose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure* **12**: 1413-28.
56. **Klebe, R.J., Harris, J.V., Sharp, Z.D., Douglas, M.G., (1983):** A general method for polyethylen-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast *Gene* **25**: 333-341
57. **Kraulis, P.J., Raine, A.R.C., Gadhavi, P.L. und Laue, E.D. (1992):** Structure of the DNA binding domain of zinc Gal4. *Nature* **356**:448

58. **Krishna, S.S., Zhou, T., Daugherty, M., Osterman, A. & Zhang, H. (2001).** Structural Basis for the Catalysis and Substrate Specificity of Homoserine Kinase. *Biochemistry* **40**, 10810-10818.
59. **Lämmli, U.K., (1970):** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage Tu. *Nature* **227**, 680
60. **Laughon, A. and Gesteland, R.F., (1984):** Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 260-267
61. **Lazo, P.S., Ochoa, A.G. and Gascon, S., (1977):** α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localization and purification of the extracellular enzyme. *Eur. J. Biochem.* **77**: 375-382
62. **Lazo, P.S., Ochoa, A.G. and Gascon, S., (1978):** α -galactosidase (melibiase) from *Saccharomyces carlsbergensis*: structural and genetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**: 316-324
63. **Le Douarin, B., Pierrat, B., von Baur, E., Chambon, P. & Losson, R. (1995).** A new version of the Two-Hybrid assay for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **23**, 876-878.
64. **Leloir, L.F., (1951):** The enzymatic transformation of uridine-diphosphate-Glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem.* **33**:186-90
65. **Leonardo, J.M., Bhairi, S.M. und Dickson, R.C. (1987)** Identification of upstream activator sequences that regulate induction of the β -galactosidase gen in *Kluyveromyces lactis*. *Mol.Cell. Biol.* **7**. 4369-4376
66. **Leuther, K.K. & Johnston, S.A. (1992).** Nondissociation of Gal4p and Gal80p *in vivo* after galactose induction. *Science* **256**, 1333-1336.
67. **Leuther, K.K., Salmeron, J.M. and Johnston, S.A., (1993):** Genetic evidence that an activation domain of *GAL4* does not require acidity and may form a β sheet. *Cell* **72**: 575-585
68. **Liljestrom., P.L., (1985):** The nucleotide sequence of the yeast *MEL1* gene. *Nucl. Acids Res.* **13**: 7257-7268
69. **Lin, Y.S. and Green, M.R., (1991):** Mechanisms of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. *Nature* **64**: 971-981
70. **Lin-Goerke, J. L., Robbins, D. J. & Burczak, J. D. (1997).** PCR-Based Random Mutagenesis Using Manganese and Reduced dNTP Concentration. *BioTechniques* **23**, 409-412.
71. **Lue, N.F., Chasman, D.I., Buchman, A.R. and Kornberg, R.D., (1987):** Interaction of *GAL4* and *GAL80* gene regulatory proteins *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3446-3451
72. **Kopperschläger, G. und Johannson, G. (1982):** Affinity partitioning with polymer-bound cibracon blue F3G-A for rapid , large scale purification of phosphofructokinase of baker's yeast. *Anal.Biochem.* **124**. 117-124.
73. **Kornberg, R.D. und Lorch, Y. (1991):** Irresistible force meet immovable object: transcription and the nucleosome. *Cell* **67** (5): 833-6.
74. **Ma, J., & Ptashne, M. (1987).** The carboxy-terminal 30 amino acids of *GAL4* are recognized by *GAL80*. *Cell* **50**, 137-142.
75. **Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982):** Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
76. **Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., Harrison, R.C., (1992):** DNA recognition by Gal4: Structure of a protein-DNA complex. *Nature.* **356**:408-14
77. **Melcher, K. (1997).** Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a paradigm for eukaryotic gene regulation. In *Yeast Sugar Metabolism* (Zimmermann, F. K. & Enzian, K.-D., eds) pp. 235-269, Technomic Publishing Inc. Lancaster, PA

78. **Melcher, K., Xu, H.E., (2001):** Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete *GAL* gene repression. *EMBO J.* Feb 15;20(4):841-51
79. **Meyer, J., Walker-Jonah, A. & Hollenberg, C.P. (1990).** *Gall* of *Kluyveromyces lactis* is Required for the Induction of the Leloir Enzymes and can Complement the *gal3* Long Term Adaptation Phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 591- 595
80. **Meyer, J., (1993):** Galaktokinase-ein regulatorisches Protein des Laktose/Galaktose-Metabolismus in Hefe. Dissertation, Universität Düsseldorf
81. **Meyer, J., Walker-Jonah, A. & Hollenberg, C.P. (1991).** Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for induction fo the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to supress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol* 11, 5454-5461.
82. **Mundkur, B.D., (1952):** Long term adaptation to galactose by yeast *Genetics* 37: 484-502
83. **Mylin, L.M., Bhat, J.P., Hopper, J.E., (1989):** Regulated Phosphorylation and Dephosphorylation of *GAL4*, a Transcriptional Activator. *Genes Dev.* 3: 1157-1165
84. **Mylin, L.M., Johnston, M., Hopper J.E., (1990):** Phosphorylated forms of *GAL4* are correlated with ability to activate transcription. *Mol.Cell.Biol.* 10: 4623-4629 Nature 356: 408-414
85. **Nehlin, J.O., Carlberg, M., Ronne, H., (1991):** Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the Glukose response. *EMBO J.* 10:3373-77
86. **Nikolaev, A.Y, Li, M. Puskas, N. Qin, J. and Gu, W.(2003):** Parc:A Cytoplasmic Ancor for p53. *Cell* Vol.112, 29-40.
87. **Nogi, Y & Fukasawa, T. (1984).** Nucleotide sequence of the yeast regulatory gene *GAL80*. *Nucleic Acids Res.* 12, 9287-9298.
88. **Nogi, Y & Fukasawa, T. (1989).** Functional domains of a negative regulatory protein *GAL80* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3009-3017.
89. **Nogi, Y., Matsumoto, K., Toh-e, A. & Oshima, Y. (1977).** Interaction of super-repressible and dominant constitutive mutations for the synthesis of galactose pathway enzymes in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 152, 137-144.
90. **Pan, T. and Coleman, J., (1989):** Structure and function of the Zn(II) binding site within the DNA-binding domain of the *GAL4* transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3145-3149
91. **Pan, T., Halverson, Y.-D.C., Dickson, R.C., Coleman, J.E., (1990):** The transcription factor *LAC9* from *Kluyveromyces lactis* like *GAL4* from *Saccharomyces cerevisiae* forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *J. Biol. Chem.* 265:21427-429
92. **Parthun, M.R. and Jaehning, J.A., (1992):** A transcriptionally active form of *GAL4* is phosphorylated and associated with *GAL80*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4981-4987
93. **Peng, G. & Hopper, J.E. (2000).** Evidence for Gal3p's Cytoplasmatic Location and Gal80p's Dual Cytoplasmic-Nuclear Location Implicates New Mechanisms for Controlling Gal4p Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5140-5148.
94. **Peng, G. & Hopper, J.E. (2002).** Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmatic signaling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 8548-8553.
95. **Pfeiffer, K., Arcangioli, B., Guarente, L., (1987):** Yeast *HAP1* activator competes with the factor *RC2* for binding to the upstream activation site UAS1 of the *CYCI* gene *Cell* 49: 9-18
96. **Phizicky, E.M. und Fields, S. (1995):** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 59:94-123.

97. Pieper, U., Eswar, N., Stuart, A. C., Ilyin, V. A. & Sali, A. (2002). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models. *Nucl. Acids Res.* **30**, 255-259.
98. Platt, A. & Reece, R. J. (1998). The galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p-complex. *EMBO J.* **17**, 4086-4091.
99. Platt, A., Ross, H.C., Hankin, S., Reece, R.J., (2000): The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 28;97(7):3154-9
100. Post-Beittenmiller, M.A., Hamilton, R.W., Hopper, J.E., (1984): Regulation of basal and induced levels of the *MEL1* transcript in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1238-1245
101. Ptashne, M., (1986): Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322**:697-701
102. Ptashne, M., (1988): How eucaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**:683-89
103. Riley, M.I. & Dickson, R.C. (1984). Genetic and biochemical characterization of the GAL gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **158**, 705-712.
104. Riley, M.I., Hopper, J.E., Johnston, S.A. & Dickson, R.C. (1987). *GAL4* of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: Glukose repression of the regulon. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 780-786.
105. Roberts, S.G.E. and Green, M.R., (1994): Activator induced conformational change in the general transcription factor TFIIB. *Nature* **371**: 717-720
106. Rohde, J.R., Trinh, J., Sadowski, I., (2000): Multiple signals regulate *GAL* transcription in yeast. *Mol Cell Biol* **20**(11):3880-6
107. Romanowski, M.J., Bonanno, J.B. & Burley, S.K. (2002). Crystal Structure of the *Streptococcus pneumoniae* Phosphomevalonate Kinase, a Member of the Ghmp Kinase Superfamily. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **47**, 568-571.
108. Ruzzi, M., Breunig, K.D., Ficca, A.G. and Hollenberg, C.P., (1987): Positive regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 992-997
109. Salmeron, J. M., Langdon, S.D. & Johnston, S. (1989). Interaction Between Transcriptional Activator Proteins *LAC9* and Negative Regulatory Protein *GAL80*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2950-2956.
110. Salmeron, J.M. & Johnston, S. (1986). Analysis of *Kluyveromyces lactis* Positive Regulatory Gene *LAC9* Reveals Functional Homology to, but Sequence Divergence from the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* Gene. *Nucl. Acids Res.* **14**, 7767-7781.
111. Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A., (1990): The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *TIBS* **15**: 430-434
112. Selleck, S.B. and Majors, J., (1987): In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3260-3267
113. Sheetz, R.M. & Dickson, R.C. (1981). *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **98**, 792-745.
114. Shimada, H. und Fukasawa, T. (1985): Controlled Transcription of the Yeast Regulatory Gen *GAL80*. *Gene* **39**:1-9.
115. Sil, A.K., Alam, S., Xin, P., Ma, L., Morgan, M., Lebo, C.M., Woods, M.P. & Hopper, J.E. (1999). The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7828-7840.

116. **Spee, J. H., de Vos, W. & Kuipers, O. P. (1993).** Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res.* **21**, 777-778.
117. **Sreekrishna, K., Dickson, R.C., (1985):** Construction of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7909-7913
118. **St. John, T., Scherer, S., McDonell, M. and Davis, R., (1981):** Deletion analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL gene cluster. *J. Mol. Biol.* **152**: 317-334
119. **Struhl, K. (1995)** „Yeast transcriptional regulatory mechanisms.“ *Annu.Rev.Genetics* **29**, 651-74.
120. **Struhl, K., (1989)** „Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast.“ *Annu.Rev.Biochem.* **58**, 1051-77.
121. **Suckow, M. & Hollenberg, C.P. (1998).** The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p *in vivo* can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **276**, 887-902.
122. **Suzuki-Fujimoto, T., Fukuma, M., Yano, K.J., Sakurai H., Vonika, A., Johnston, S.A. & Fukasawa, T. (1996).** Analysis of the Galactose Signal Transduction Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: Interaction Between Gal3p and Gal 80p. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7566-7576.
123. **Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
124. **Timson, D.J., Ross, H.C. & Reece, R.J. (2002).** Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex with 1:1 stoichiometry. *Biochem J.* **363**, 515-20.
125. **Torchia, T.E., Hamilton, R.W., Cano, C.L. und Hopper, J.E. (1984):** Disruption of the GAL80 in *S. cerevisiae*: effects on carbon controlled regulation of the galactose/melibiose pathway genes. *Mol. Cell. Biol.* **16** (5): 2504-2508.
126. **Torchia, T.E., Hopper, J.E., (1986):** Genetic and molecular analyses of the *GAL3* gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics* **113**: 229-246
127. **Treitel, M.A., Kuchin, S., Carlson, M., (1998):** Snf1-Protein-Kinase regulates phosphorylation of the Mig1 Repressor in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**(11):6273-80
128. **Treitel, M.A., Carlson, M., (1995):** Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**:3132-36
129. **Trietzenberg, S.J., Kingsbury, R.C., Mc Knight, S.L., (1988):** Functional dissection of VP16, the transactivator of Herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2**:718-29
130. **Trumbly, R.J., (1992):** Glukose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**:15-21
131. **Tsai, Y.H., and Robinson, G.W., (1991):** Cloning and characterization of ERG8, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 620-631
132. **Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. (1993).** Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214.
133. **Vollenbroich, V. (1998):** untersuchungen zur Interaktion zwischen Gal1p und Gal80p während der Induktion des Galaktoseregulons in Hefe. Dissertation, Universität Düsseldorf
134. **Vollenbroich, V., Meyer, J., Engels, R., Cardinali, G., Menezes, R. A. & Hollenberg, C. P. (1999).** Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 495-507.

135. **Wang, H., Kohalmi, E. und Cutler, A.J. (1996):** An Improved Method for Polymerase Chain Reaction Using Whole Cell Yeast Cells. *Anal. Bioch.* **237**: 145-146.
136. **Webster, T.D. and Dickson, R.C., (1988):** The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8011-8028
137. **Wésolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H., (1995):** A map of the *Kluyveromyces lactis* genome. *Yeast* **11**: 211-218
138. **Winge, O. und Roberts, C (1948):** Inheritance of enzymatic characters in yeast and the phenomenon of long-term adaption. *C.R.Trav.Lab.Carlsberg.Ser.Physiol.* **24**: 264-315
139. **Wilson, D.B. und Schell, M.A. (1982):** Galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, **90**.
140. **Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G., (1996):** Glukose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by Phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* **6**:1426-34
141. **Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M. und Carling, D. (1994):** Yeast Snf1 is functionally related to mammalian AMP activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**: 19509-19515.
142. **Wray, L.V.J., Witte, M.W., Dickson, R.C. und Riley, M.I. (1987):** Characterization of a positive regulatory gene, *LAC9*, that controls induction of lactose-galactose regulon of *kluyveromyces lactis*: Structural and Functional Relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1111-1121.
143. **Wu, Y., Reece, R.J., und Ptashne, M. (1996):** Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.* **15**: 3951-3963.
144. **Yang, D., Shipman, L.W., Roessner, C.A., Scott, A. I. & Sacchettini, J.C. (2002).** Structure of the *Methanococcus Jannaschii* Mevalonate Kinase, a Member of the Ghmp Kinase Superfamily. *J.Biol.Chem.* **277**, 9462 –9467.
145. **Yano, K.I. & Fukasawa, T. (1997).** Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p and Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1721-1726.
146. **Zachariae, W., Kuger, P., Breunig, K.D., (1993):** Glukose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LAC9 (KIGAL4)*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 69-77
147. **Zenke, F., Engels, R., Vollenbroich, V., Meyer, J., Hollenberg, C.P. & Breunig, K. D. (1996).** Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of Galactokinase and Gal80p. *Science* **272**, 662-1665.
148. **Zenke, F., Kapp, L. & Breunig, K.D. (1999).** Regulated Phosphorylation of the Gal4p Inhibitor Gal80p of *Kluyveromyces lactis* Revealed by Mutational Analysis. *Biol. Chem.* **380**, 419-430.
149. **Zenke, F.T. , Zachariae, W. , Lunkes, A. & K.D. Breunig. (1993).** Gal80 Proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are Highly Conserved but Contribute Differently to Glukose Repression of the Galactose Regulon. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7566-7576.
150. **Zenke, F.T., (1995):** Regulation des Lac9-Inhibitors Gal80p in Hefe. Dissertation, Düsseldorf.
151. **Zhou, T., Daugherty, M., Grishin, N. V., Osterman, A. L. & Zhang, H. (2000)** Structure and Mechanism of Homoserine Kinase Prototype for the GHMP Kinase Superfamily. *Structure with Folding and Design*, **8**: 12, 1247-1257.

7. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HMW	High Molecular Weight
KARS	Autonom replizierende Sequenz (<i>K. lactis</i>)
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
min	Minute
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N-	Amino-
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	Polyoxybenzethylensorbitanmonoaurat
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜT	über Tag
UV	Ultraviolett
V	Volt
x	mal
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
YEPD	Yeast Extract/Peptone/Dextrose
YNB	Yeast Nitrogen Base

Die Aminosäuresequenzen wurden im Ein- und Dreibuchstabencode nach den Regeln der "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" angegeben (Eur. J. Biochem. 5 [1968], 151-153)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, Juni 2003

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg für die Überlassung des Themas, die Betreuung und sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und für stundenlange engagierte, interessante und zudem sehr lehrreiche Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U.A.O. Heinlein für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke Frau Ute Gengenbacher für das angenehme Arbeitsklima und ihre starke Unterstützung bei der Aufreinigung der Proteine Gal1 und Gal80.

Ich danke Frau Katja Mölleken und Herrn Christian Winkler für Ihr Engagement während ihrer Diplomarbeiten in der AG Hollenberg (sie haben es nicht immer leicht gehabt mit mir).

Ich danke Herrn Igo Spode für sein immer offenes Ohr und angeregte Diskussionen aller erdenklichen Themen.

Ich danke dem gesamten Institut für Mikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima und die tolle Zeit auch ausserhalb der Universität.

Ganz herzlich möchte ich auch Frau Anna Nagy für Ihren unermüdlichen Einsatz in der Spülküche danken.

Herrn Dr. R. Roggenkamp, Herrn U. Kleinhans und Frau H. Gurk danke ich für Ihre Unterstützung in allen organisatorischen und finanziellen Bereichen.

Ich danke Frau Dr. R. Engels und Frau Dr. R.A. Menezes für ihre Einführung in die Welt der *GAL*-Gene.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Büldt, Herrn Dr. J. Labahn und Herrn Dr. S. Stork für ihre Unterstützung bei der Kristallisierung der Proteine Gal1 und Gal80 und dem Homologie-Modelling von Gal1.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. G. Gellissen und Herrn Dr. M. Suckow bedanken, die trotz meiner Abtrünnigkeit von *H. polymorpha* immer an mich gedacht haben.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums und meinem kleinen Bruder Wolfgang, der es immer wieder schafft, Leben in die Bude zu bringen.

Ich danke Herrn Axel Kötteritzsch, der stets um mein leibliches Wohl besorgt war und mich zum Frühstück mit unzähligen Apfelringen gemästet hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Ira Melchheier bedanken, die nicht nur versucht hat, jedes noch so überflüssige Komma dieser Arbeit zu entfernen, sondern auch neben der Universität eine ganz liebe Freundin geworden ist und stets meine Launen ertragen hat. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Vicco Dierkes für die tolle Zeit in Ägypten, in Holland, beim Golfen, am Nürburgring, am Hockenheimring, am Pool seiner Eltern und für seine Freundschaft bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	↻ Carsten Amuel
Anschrift	↻ Niersteiner Weg 13 40229 Düsseldorf Tel.: (0211) 6014847
geboren am	↻ 04.04.1973 in Ratingen
Familienstand	↻ ledig

Schulbildung

1979-1983	↻ St. Suitbertus Grundschule in Ratingen
1983-1992	↻ Heinrich-Heine-Gesamtschule in Düsseldorf mit Abitur

Ersatzdienst

1992-1993	↻ Ausbildung zum Rettungs-Sanitäter bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Ratingen-Lintorf
-----------	---

Hochschulstudium

WS 1993	↻ Beginn des Biologiestudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
07/1996	↻ Vordiplomprüfungen
WS 1996 - WS 1998	↻ Hauptstudium
10/1998	↻ Diplomprüfungen
11/98 - 10/99	↻ Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität bei Herrn Prof.Dr. C.P. Hollenberg und Herrn Dr. M. Suckow in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. G. Gellissen der Firma „Rheinbiotech“ in Düsseldorf

Thema der Diplomarbeit:

Promotorstudien in der Hefe „*Hansenula polymorpha*“

seit 11/99	↻ Promotion am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität bei Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg
------------	--

Thema der Promotion:

"Untersuchungen zur Funktion und Struktur des Proteins Gal1p der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*".

Fortbildungen

02/02	↻ Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit (BBS) und Gentechniksicherheitsverordnung (GenTSV) mit dem Thema: Gentechnikrecht bei Herrn Prof. Dr. Schaal an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität zu Bonn
-------	--

Düsseldorf,