

Wahrnehmung von
Biotinmangel durch
Saccharomyces cerevisiae

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Heike Stüer, geb. Pirner

aus Waldershof

Februar, 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.02.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. J. Stolz

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. T. Dresselhaus

1. Prüfer: PD Dr. J. Stolz

2. Prüfer: Prof. Dr. R. Sterner

3. Prüfer: Prof. Dr. G. Längst

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Vitamine	1
1.2	Biotin	2
1.2.1	Vorkommen und Mangelerscheinungen	3
1.2.2	Nomenklatur und Chemie	4
1.2.3	Biochemische Funktion und biotinylierte Proteine	4
1.2.3.1	Proteinbiotinylierung	5
1.2.3.2	Biotinabhängige Carboxylasen	7
1.2.3.3	Konservierte Biotinbindedomäne	8
1.2.3.4	Biotinproteine von <i>E. coli</i> , Hefe und Mensch	11
1.2.4	Biotinidase und Biotinylierung von Histonen	12
1.2.5	Biotinbiosynthese	13
1.2.6	Biotintransport	16
1.2.7	Biotinabhängige Regulation der Genexpression	18
1.2.8	Biotechnologische Anwendungen	22
1.3	Zielsetzung	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Material	25
2.1.1	Organismen	25
2.1.2	Plasmide und Genbank	27
2.1.2.1	<i>E. coli</i> Vektoren	27
2.1.2.2	<i>E. coli</i> – <i>S. cerevisiae</i> Shuttle- Vektoren	27
2.1.2.3	Genbank	28
2.1.3	Oligonukleotide	28
2.1.4	Puffer und Lösungen	30
2.1.5	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	32
2.1.6	Geräte	33
2.1.7	Internetdienste	33
2.1.8	Software	34
2.2	Methoden	34
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1.1	Medien	34
2.2.1.2	Anzuchtbedingungen	36
2.2.1.3	Dauerkulturen	37
2.2.1.4	Wachstumstest	37
2.2.1.5	Kreuzen von Hefestämmen	37
2.2.1.6	Tetradenanalyse	37
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	38
2.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.2.2.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	38
2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39

2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> (Plasmid-Rescue)	39
2.2.2.6	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.7	Phenolextraktion von DNA	40
2.2.2.8	Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.2.2.9	Agarosegelelektrophorese und DNA-Elution	40
2.2.2.10	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.2.11	Klonierungstechniken	40
2.2.2.12	DNA-Sequenzierung	41
2.2.2.13	EMS-Mutagenese	41
2.2.2.14	Herstellung verschiedener Stämme	41
2.2.2.15	Klonierung verschiedener Plasmide	43
2.2.3	Biochemische Methoden	43
2.2.3.1	Gesamtproteinextraktion	43
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.3.3	Western Blot-Analyse	44
2.2.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.2.3.5	β -Galaktosidase-Aktivitätstest	45
2.2.3.6	Aufnahmetest mit ^{14}C -markiertem Biotin	46
2.2.4	Bestimmung der Konzentration an freiem Biotin in <i>S. cerevisiae</i>	46
2.2.4.1	Herstellung von Biotinyl-BSA	46
2.2.4.2	Zellextrakt zur Biotin-Bestimmung	46
2.2.4.3	ELISA-Test	47
2.2.4.4	Prüfung der Spezifität des ELISA-Tests	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Die Biotinmangelantwort auf Transkriptions- und Translationsebene	49
3.1.1	Das BRE-Promotorelement als Vermittler der Biotinmangelantwort	49
3.1.1.1	Die BRE-Sequenz ist ein konserviertes DNA-Element in den Promotoren der Biotingene	49
3.1.1.2	Das BRE-Element ist nötig für die Biotinmangelantwort	52
3.1.1.3	Das BRE-Element ist hinreichend für die Biotinmangelantwort	56
3.1.1.4	Auch im <i>B/O2</i> -Promotor wird das Niedrig-Biotinsignal über das BRE-Element vermittelt	57
3.1.2	Genomweite Suche nach durch Biotinmangel induzierten Genen	58
3.1.2.1	Biotinmangel induziert Gene des Biotinmetabolismus	58
3.1.2.2	Biotingene zeigen auch auf Proteinebene eine biotinabhängige Induktion	61
3.2	Suche nach dem Signalgeber der Biotinmangelantwort	63
3.2.1	Biotinwahrnehmung ist unabhängig von der extrazellulären Biotinkonzentration	63
3.2.2	Mangel an KAPA führt zu einer typischen Biotinmangelantwort	66
3.2.3	Die Aktivität der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p beeinflusst die Biotinwahrnehmung	70
3.2.4	Die Rolle der biotintragenden Enzyme	73
3.2.5	Aktive Pyruvatcarboxylasen sind eine Voraussetzung für die Biotinmangelantwort	80
3.3	Ungerichtete Mutagenese zur Aufklärung der Signalkette	85
3.3.1	EMS-Mutagenese und Identifizierung von Klonen mit konstitutiver Biotinmangelantwort	87

3.3.2 Suche nach Genen, die bei Überexpression eine Biotinmangelantwort auslösen	99
4 DISKUSSION	109
4.1 Die Aktivierung der Biotingene erfolgt über das BRE-Promotorelement	109
4.2 Die Wahrnehmung von Biotin erfolgt intrazellulär ohne die Beteiligung des Biotintransporters Vht1p	113
4.3 Die Rolle der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p bei der Biotinwahrnehmung	114
4.4 Die Pyruvatcarboxylasen spielen eine direkte Rolle bei der Biotinwahrnehmung	118
4.5 Vhr1p ist ein essentielles Protein in der Biotinwahrnehmung	123
4.6 Ungerichtete Suche nach Mitgliedern der Biotinsignalkette und Verküpfungen zwischen Biotin- und Eisenmetabolismus	127
5 ZUSAMMENFASSUNG	131
6 LITERATURVERZEICHNIS	132
7 EIGENE PUBLIKATIONEN	153
ANHANG	154
DANKSAGUNG	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	DTB	Desthiobiotin
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz	E	Enzym
Ac	Acetat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase	ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
AT	3-Aminotriazol	EtOH	Ethanol
Amp, Amp ^R	Ampicillin, Ampicillinresistenz	EMS	Ethylmethansulfonat
AMP, ATP	Adenosinmonophosphat, Adenosintriphosphat	FS	Fettsäuren
ARE	AU-rich element	Gal	Galaktose
AS	Aminosäure	Glc	glucose (Glukose)
B-AMP	Biotinyl-AMP	GFP	green fluorescent protein
bp	Basenpaare	h	Stunde
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein	HCS	Holocarboxylasesynthetase
BPL	Biotin-Protein-Ligase	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
BPS	Bathophenanthrolin-disulfonat	IC	Inositol/Cholin
BRE	biotin response element	KAPA	7-Keto-8-aminopelargonsäure
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)	kb	Kilobase
C-Terminus	Carboxyterminus	kDa	Kilodalton
d	Tag	KLF	Krüppel-like factor
DAB	Diaminobiotin	K_m	Michaelis-Menten-Konstante
DAPA	Diaminopelargonsäure	l	Liter
DMF	Dimethylformamid	M	Molar, mol/l
DMSO	Dimethylsulfoxid	MCC	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minuten
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat	MG	Molekulargewicht
DOA-Radikal	5'-Deoxyadenosylradikal	MMA	synthetisches Minimalmedium
		MWCO	molecular weight cut off
		NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
		N-Terminus	Aminoterminus

OD _x	optische Dichte bei x nm	Strep-PO	Streptavidin Peroxidase
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-Galactopyranosid		Konjugat
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)	Tab.	Tabelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PCR	Polymerasekettenreaktion	UAS	upstream activating sequence
PEG	Polyethylenglykol	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	ÜN	über Nacht
PYC, Pyc	Pyruvatcarboxylase	UTR	untranslated region
PLP	Pyridoxalphosphat	v/v	Volumen/Volumen
RNA	Ribonukleinsäure	Vit	Vitamin
RNase A	Ribonuclease A	vgl.	vergleiche
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)	w/o	ohne
RT	Raumtemperatur	WT	Wildtyp
s	Sekunde	w/v	Masse/Volumen
SAM	S-Adenosylmethionin	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
SDS	Natriumdodecylsulfat	YNB	Yeast Nitrogen Base
SMVT	sodium-dependent multivitamin transporter		

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Nukleobasen

A	Ade	Adenin	T		Thymin
C		Cytosin	U	Ura	Uracil
G		Guanin			

1 Einleitung

Es ist für Zellen lebensnotwendig, Umweltbedingungen wahrzunehmen und sich an diese anzupassen. Auch die Bäckerhefe, ein guter Modellorganismus, kann auf Veränderungen in der Umgebung reagieren, die Mechanismen sind aber oftmals nicht genau bekannt. Wichtige Parameter sind hierbei die Auswahl und das Angebot an Nährstoffen, Mineralien, Spurenelementen und Signalstoffen (z.B. Pheromonen) und nicht zuletzt auch die Verfügbarkeit von Vitaminen.

1.1 Vitamine

Den ausschlaggebenden Beitrag zur Entdeckung der Vitamine lieferte Frederick G. Hopkins mit seinen Fütterungsexperimenten zu Beginn des 20. Jahrhunderts, obwohl durch Vitaminmangel bedingte Krankheiten schon seit langem bekannt und bis in die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts weit verbreitet waren. Er erkannte, dass junge Ratten sich nur dann normal entwickelten, wenn ihnen zu einem Gemisch aus Proteinen, Fetten, Kohlenhydraten und Mineralien täglich eine kleine Menge Milch gefüttert wurde. Daraus schloss er, dass der Körper auf die Zufuhr von Substanzen angewiesen ist, die er als „accessory growth factors“ bezeichnete. Bei der Untersuchung der Mangelkrankheit Beriberi wurde der erste Wachstumsfaktor (später Thiamin genannt) identifiziert. Da dieser eine Aminogruppe trug, prägte Casimir Funk 1912 den Ausdruck Vitamin. „Vita“ (lateinisch) steht dabei für Leben. Obwohl die meisten weiteren Faktoren keine Amine waren, hat der Name bis heute Bestand. Mit der Isolierung von Folsäure im Jahr 1941 war schließlich die Entdeckung aller 13 Vitamine abgeschlossen.

Vitamine sind chemisch unterschiedliche organische Verbindungen und haben zudem viele verschiedene metabolische Funktionen. So spielen sie nicht nur als Coenzyme (niedermolekulare, nicht proteinartige Verbindungen) eine wichtige Rolle, sondern wirken auch als Hormone, Antioxidantien, Überträger von Zellsignalen und Regulatoren von Zell- und Gewebewachstum [Bender, 2003]. Definitionsgemäß sind Vitamine essentielle Nahrungsbestandteile und werden nur in geringen Mengen benötigt. Damit unterscheiden sie sich deutlich sowohl von den essentiellen Mineralien und Spurenelementen (anorganisch) als auch den essentiellen Aminosäuren und Fettsäuren, die als Energiequellen bzw. Baumaterial in größeren Mengen gebraucht werden [Bender, 2003]. Vitamine sind lebenswichtig, können jedoch vom Organismus nicht oder nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden. Werden sie nicht durch die Nahrung aufgenommen, führt dies zu einer Mangelkrankheit. Bei manchen Vitaminen existieren sogenannte Vitamere.

Dies sind chemisch verwandte Verbindungen, die die gleiche biologische Aktivität besitzen, d.h. sie zeigen ausreichende strukturelle Ähnlichkeiten oder werden zu dem gleichen Endmetaboliten umgesetzt [Bender, 2003].

Neben ihren systematischen chemischen Namen besitzen die Vitamine oft mehrere Trivialnamen, die durch ihre Entdeckungsgeschichte zu erklären sind. Die Benennung der Vitamine mit Großbuchstaben begann mit Elmer Verner McCollum [Penzlin, 2006]. Aufgrund seiner Fütterungsversuche an Tauben unterteilte er die Vitamine in die Faktoren A (fettlöslich) und B (wasserlöslich) [McCollum und Kennedy, 1916]. Als die einzelnen aktiven Komponenten des Faktors B in Reinform isoliert wurden, wurden die Isolate mit B₁, B₂ usw. bezeichnet, wobei einige der so benannten Substanzen heute nicht mehr zu den Vitaminen gezählt werden.

Die Biosynthesekette von Vitaminen wurde während der Evolution häufig durch Defektmutationen unterbrochen [Bässler *et al.*, 2002], wodurch viele höhere Organismen ein typisches Set an Vitaminen benötigen. Im Folgenden wird der Begriff „Vitamin“ für die 13 Stoffe oder Stoffgruppen eingesetzt, die für den Menschen essentiell sind. Dazu gehören die fettlöslichen Vitamine A (Retinol, Retinal, Retinsäure, β -Carotine als Provitamin A), D (Calciferole), E (Tocopherole, Tocotrienole) und K (Phyllochinon, Menachinon) und die wasserlöslichen Vitamine B₁ (Thiamin), B₂ (Riboflavin), Niacin (Nicotinsäure, Nicotinamid), B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin), B₁₂ (Cobalamine), Pantothensäure, Biotin, Folsäure und C (Ascorbinsäure).

Bei Pflanzen und manchen Mikroorganismen ist die Fähigkeit zur Biosynthese von Vitaminen erhalten geblieben. Aus diesem Grund können Menschen ihren Vitaminbedarf sowohl durch pflanzliche als auch tierische Nahrung decken, wobei die Tiere ihrerseits die Vitamine durch pflanzliche Nahrung aufgenommen oder die bakteriell hergestellten Stoffe aus dem Darmtrakt resorbiert haben [Bässler *et al.*, 2002].

1.2 Biotin

Biotin ist das im eigentlichen Sinne einzige Vitamin bei fast allen Stämmen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* [Leonian und Lilly, 1942; Burkholder, 1943; Koser, 1968]. Es gehört zur B-Gruppe und wirkt als prosthetische Gruppe, kovalent gebunden an Apoenzyme. Da ein klinischer Biotinmangel bei Menschen recht selten auftritt, wurde die Wichtigkeit des Biotins für den Metabolismus zuerst bei Mikroorganismen erkannt.

Seine Entdeckung begann Anfang des 20. Jahrhunderts, als E. Wildiers feststellte, dass für das Wachstum von Hefezellen neben den von Pasteur geforderten Nährstoffen - die Asche der Hefe, Ammoniumsalz und ein vergärbare Zucker [Pasteur, 1860] - ein besonderer kochfester organischer Stoff Namens „Bios“ nötig sei [Wildiers, 1901]. Wie sich nachfolgend herausstellte,

war Bios jedoch ein Substanzgemisch und wurde später in Bios I (Meso-Inosit), Bios IIa und Bios IIb (gleich Biotin [Kögl und Tönnis, 1936]) unterteilt. 1936 konnten Kögl und Tönnis erstmals 1,1 mg Biotin durch Fraktionierung von 250 kg Trockeneigelb in kristalliner Form gewinnen [Kögl und Tönnis, 1936]. Die Struktur von Biotin wurde 1942 von du Vigneaud aufgeklärt [du Vigneaud, 1942] und 1943 durch Harris *et al.* erstmals chemisch synthetisiert [Harris *et al.*, 1943]. Parallel dazu wurde Biotin auch als „Vitamin H“ oder „Schutzfaktor X“ entdeckt, weil es die schädliche Wirkung rohen Eiweißes auf Haut und Haare bei mehreren Tierarten abschwächte [Koser, 1968; Bender, 2003]. In Eiweiß befindet sich nämlich das Glykoprotein Avidin (vgl. Kapitel 1.2.8) welches Biotin mit hoher Affinität bindet [Eakin *et al.*, 1941]. Dieser Komplex kann durch proteolytische Enzyme nicht gespalten werden, das so gebundene Biotin ist damit nicht bioverfügbar. Weitere Namen für Biotin waren Coenzym R (Faktor, der für die Zellatmung und Wachstum bei *Rhizobium* gebraucht wurde [Allison *et al.*, 1933; Allison und Hoover, 1934]), Vitamin B_W und Vitamin B₇.

1.2.1 Vorkommen und Mangelscheinungen

Biotin wird von Bakterien, Pflanzen und einigen Pilzen synthetisiert [Marquet *et al.*, 2001]. Es ist zwar in der Natur weit verbreitet, kommt aber in Lebensmitteln in nur geringen Konzentrationen vor. Gute Biotinquellen sind Milch, Eier, Leber, Niere, einige Gemüsesorten und Cerealien. Das Vitamin liegt dabei zum Teil in freier Form, oft aber an Proteine gebunden vor. Nach der Freisetzung durch das Enzym Biotinidase (vgl. Kapitel 1.2.4) wird Biotin im proximalen Dünndarm aufgenommen [Koser, 1968; Bässler *et al.*, 2002].

Laut Schätzungen ist der Biotinbedarf eines erwachsenen Menschen etwa 30 – 60 µg/Tag [Bässler *et al.*, 2002] bzw. 10 – 200 µg/Tag [Bender, 2003]. Klassische Symptome eines Biotinmangels sind Haarausfall, brüchige Nägel, Entzündungen von Haut und Zunge (Dermatitis, Glossitis), Anorexie, Übelkeit, Anämie, Hypercholesterinämie, Störung der Herzfunktion und Depressionen. Die Deckung des Biotinbedarfs ist jedoch normalerweise nur bei Risikogruppen, zu denen z.B. Schwangere, vollgestillte Säuglinge, Hämodialysepatienten oder Alkoholiker gehören, oder nach Einnahme von Biotin-Antagonisten gefährdet [Bässler *et al.*, 2002]. Dies deutet auf einen großen Beitrag der intestinalen Synthese hin.

Daneben führen auch genetische Störungen wie Biotinidasemangel, Defekte der Holocarboxylase-synthetase (vgl. Kapitel 1.2.3.1) oder multiple Carboxylasedefekte zu einem stark erhöhten Biotinbedarf.

1.2.2 Nomenklatur und Chemie

Biotin (Summenformel $C_{10}H_{16}N_2O_3S$) ist ein bizyklisches Molekül aus miteinander verbundenen Imidazolidon (Ureido)- und Thiophenringen. Der Thiophenring trägt eine aliphatische Seitenkette (Valeriansäure). Der IUPAC-Name von Biotin lautet cis-Hexahydro-2-oxo-1H-thieno(3,4-d)-imidazol-4-yl-valeriansäure. Obwohl es mit seinen drei asymmetrischen C-Atomen acht verschiedene Stereoisomere bilden könnte, kommt in der Natur nur das biologisch aktive D(+)-Biotin vor (Abb. 1-1).

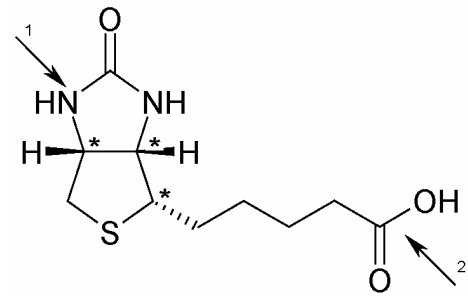


Abb. 1-1: D(+)-Biotin. Die asymmetrischen C-Atome sind mit Sternchen (*) markiert. Pfeil 1 kennzeichnet die Carboxylierungsstelle, Pfeil 2 weist auf die Carboxylgruppe, welche eine Amidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines biotintragenden Proteins eingeht.

Biotin hat ein Molekulargewicht von 244,31 g/mol, kristallisiert in feinen farblosen Nadeln und ist in heißem Wasser und verdünnten Laugen gut löslich. In organischen Lösungsmitteln ist Biotin dagegen praktisch unlöslich. In kristalliner Form ist es gegen Luft, Tageslicht und Hitze stabil [Bässler *et al.*, 2002].

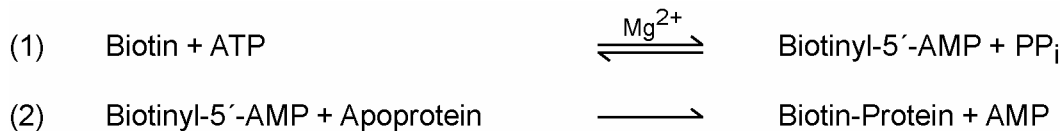
Seine katalytisch aktive Form besitzt Biotin kovalent gebunden an Enzyme (vgl. Kapitel 1.2.3.1). Industriell wird Biotin (Weltjahresproduktion etwa 30 Tonnen) durch eine ursprünglich von Goldberg und Sternbach 1949 entwickelte chemische Synthese produziert [Marquet *et al.*, 2001; Streit und Entcheva, 2003].

1.2.3 Biochemische Funktion und biotinylierte Proteine

Biotin ist die prosthetische Gruppe von einigen Carboxylasen, Decarboxylasen und Transcarboxylasen [Wood H. G. und Barden, 1977; Knowles, 1989]. Diese Enzyme sind Schlüsselenzyme von Stoffwechselwegen wie Glukoneogenese, Lipogenese und Aminosäureabbau bzw. am Aufbau von Ionengradienten, die in Energie umgewandelt werden können, beteiligt. Trotz ihrer oft unterschiedlichen Funktionen bestehen Ähnlichkeiten in der Sequenz, der Struktur und den Reaktionsmechanismen. Dabei nutzen sie den Cofaktor Biotin für den Transfer von CO_2 auf und zwischen Metaboliten [Samols *et al.*, 1988; Knowles, 1989].

1.2.3.1 Proteinbiotinylierung

Die kovalente Bindung von Biotin an einen spezifischen Lysinrest des jeweiligen Apoproteins ist eine posttranslationale Modifikation und wird durch das Enzym Biotin-Protein-Ligase (BPL) in einer Zwei-Schritt-Reaktion katalysiert [Lane *et al.*, 1964a; McAllister und Coon, 1966; Chapman-Smith *et al.*, 1999]:



In der ersten reversiblen Teilreaktion (1) reagiert Biotin mit ATP unter der Bildung des aktivierten Zwischenproduktes Biotinyl-5'-adenylat. Im zweiten irreversiblen Schritt (2) erfolgt der Transfer des Biotinylrestes vom Adenylatintermediat auf die Biotindomäne des Akzeptorproteins und AMP verlässt den Komplex. Die Carboxylgruppe der Biotinseitenkette geht dabei eine Amidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes ein [Polyak *et al.*, 1999].

Neben dem enzymatischen Mechanismus teilen sich BPLs von verschiedenen Organismen auch strukturelle Eigenschaften [Chapman-Smith und Cronan, 1999c; Mukhopadhyay *et al.*, 2001]. Eine hoch aufgelöste Kristallstruktur ist bislang aber nur von den beiden BPL-Proteinen aus *Escherichia coli* [Wilson *et al.*, 1992; Weaver *et al.*, 2001; Wood Z. A. *et al.*, 2006] und *Pyrococcus horikoshii* OT3 [Bagautdinov *et al.*, 2005; Bagautdinov *et al.*, 2008] bekannt. Daneben wurden auch die 3-D-Strukturen der Biotindomänen von vier biotintragenden Proteinen bestimmt bzw. vorhergesagt [Brocklehurst und Perham, 1993; Athappilly und Hendrickson, 1995; Yao *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Bagautdinov *et al.*, 2008]. Der genaue Mechanismus der Biotinylierungsreaktion ist allerdings noch nicht aufgeklärt [Streaker und Beckett, 2006a].

Jeder Organismus hat normalerweise eine einzige BPL, die oft auch als Holocarboxylase-synthetase (HCS) bezeichnet wird [Chiba *et al.*, 1994; Chapman-Smith und Cronan, 1999a]. Die entsprechenden Gene werden in *S. cerevisiae* *BPL1* [Cronan und Wallace, 1995], in *E. coli* *birA* [Barker und Campbell, 1981a] und beim Menschen *HCS* [Suzuki *et al.*, 1994; Leon-Del-Rio *et al.*, 1995] genannt. Des Weiteren ist HCS auch die Bezeichnung für Biotin-Protein-Ligasen bei Säugern allgemein [Chiba *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1994], sowie bei Pflanzen [Tissot *et al.*, 1996]. Alle bekannten Biotindomänen der biotintragenden Proteine weisen ähnliche Primär- und Tertiärstrukturen auf (vgl. Kapitel 1.2.3.3) [Wood H. G. und Barden, 1977; Leon-Del-Rio und

Gravel, 1994; Chapman-Smith und Cronan, 1999a, b; Cronan und Reed, 2000]. So reagiert die für den jeweiligen Organismus spezifische BPL mit allen Apocarboxylasen desselben Organismus. Die Konservierung der funktionellen Protein-Protein-Wechselwirkung zeigt dabei einen so hohen Grad, dass BPLs auch Biotinproteine anderer Spezies, zum Teil über Domänengrenzen hinweg, erkennen und modifizieren können [Kosow *et al.*, 1962; Lane *et al.*, 1964b; McAllister und Coon, 1966; Cronan, 1990; Chapman-Smith und Cronan, 1999a].

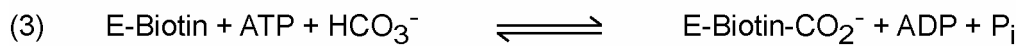
Allerdings liegt Kreuzreaktivität nicht bei jeder Ligase-Apoprotein-Kombination vor. So kann z.B. die Synthetase aus Hasenleber die bakterielle Apo-Transcarboxylase nicht modifizieren [McAllister und Coon, 1966] oder BirA zeigt kaum Reaktivität gegenüber der Apo-Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber [Bai *et al.*, 1989].

In manchen Organismen kommen BPLs in verschiedenen Kompartimenten vor. So weist beispielsweise nach Meinung von Tissot *et al.* [1997; 1998] *Arabidopsis thaliana* neben der chloroplastischen Form von HCS mindestens ein weiteres Gen für die mitochondrielle und eventuell cytosolische Form der HCS auf. Nach Puyaubert *et al.* [2008] besitzt aber nur die BPL-Isoform HCS1 BPL-Aktivität, und zwar in allen drei Kompartimenten. HCS2 spielt eine untergeordnete Rolle. Bei Säugern gibt es im Cytosol und in den Mitochondrien zwei Isoformen von HCS, welche vermutlich von demselben Gen codiert werden [Chang H. I. und Cohen, 1983; Suzuki *et al.*, 1994; Leon-Del-Rio *et al.*, 1995]. Apoproteine werden dort in beiden Kompartimenten biotinyliert und können in beiden Formen, als Apo- und auch als Holoenzym, in die Mitochondrien transportiert werden [Taroni und Rosenberg, 1991]. Hefe hat jedoch nur eine BPL, die im Cytosol lokalisiert ist [Kumar *et al.*, 2002].

Neben der hohen Konservierung der an der Biotinylierungsreaktion beteiligten Proteine ist vor allem die hohe Spezifität der enzymkatalysierten Bindung von Biotin bemerkenswert. Selbst bei Überschuss können verschiedene Biotinanaloga (z.B. Desthiobiotin, Diaminobiotin, Biocytin und Iminobiotin) den Einbau von Biotin nicht inhibieren [Lane *et al.*, 1964b; Chiba *et al.*, 1994; Tissot *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1999]. Ist kein Biotin verfügbar, wird DTB allerdings von *S. cerevisiae* BPL auf Apo-Proteine übertragen [Mühlenhoff *et al.*, 2007]. Bei *E. coli* BirA wurde dies nur *in vitro* und bei hohen DTB-Konzentrationen beobachtet [Wu S. C. und Wong, 2004; Choi-Rhee und Cronan, 2005]. Trotz des ubiquitären Auftretens von zum Teil essentiellen Biotinenzymen ist die Biotinylierung eine relativ seltene Modifikation. Denn in einem Organismus werden nur wenige, meist zwischen ein und fünf Proteine, biotinyliert [Cronan, 1990] und Biotin wird bei jedem dieser Proteine nur an einen einzigen Lysinrest gebunden [Chapman-Smith und Cronan, 1999a].

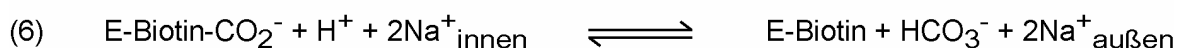
1.2.3.2 Biotinabhängige Carboxylasen

Biotintragende Proteine lassen sich in drei Klassen einteilen: Carboxylasen, Decarboxylasen und Transcarboxylasen [Samols *et al.*, 1988; Knowles, 1989]. Eine der häufigsten biotinabhängigen Reaktionen ist die Carboxylierung, d.h. die ATP-abhängige Übertragung von CO₂ auf Apoenzyme (Reaktion der Klasse I). Die Reaktion verläuft, wie auch bei den beiden anderen Klassen, nach einem Zwei-Schritt-Mechanismus.



Zu den Carboxylasen gehören die Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase, Pyruvatcarboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, Geranyl-CoA-Carboxylase (Enzym aus Mikroben) und Harnstoffcarboxylase (Enzym aus Mikroben, welche Harnstoff als alleinige Stickstoffquelle nutzen können, selbst wenn ihnen Urease fehlt) [Wood H. G. und Barden, 1977]. Die biotinabhängigen Enzyme von Eukaryoten gehören demnach alle zur Klasse I [Samols *et al.*, 1988].

Die zweite Klasse der Biotinenzyme bilden die Decarboxylasen, biotinabhängige Natriumpumpen in anaeroben Prokaryoten. Dazu gehören die Enzyme Oxalacetat-Decarboxylase, Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, Glutaconyl-CoA-Decarboxylase und Malonat-Decarboxylase [Wood H. G. und Barden, 1977; Samols *et al.*, 1988; Streit und Entcheva, 2003]. Diese Enzyme bauen Ionengradienten auf, die in Energie umgewandelt werden können [Samols *et al.*, 1988]. Der primäre aktive Transport von Natrium gegen einen Konzentrationsgradienten wird dabei nicht durch ATP angetrieben, sondern durch energiefreisetzende chemische Reaktionen, die Decarboxylierung von Substraten. Im ersten Reaktionsschritt wird die Carboxylgruppe auf Biotin übertragen. Im zweiten Schritt erfolgt die Spaltung von Carboxyl-Biotin, CO₂ wird frei.



Die Transcarboxylase ist der bislang einzige bekannte Vertreter der Klasse III der biotinabhängigen Enzyme, bei der eine Carboxylgruppe von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen wird. Sie spielt in Propionibakterien eine Schlüsselrolle in der ATP-unabhängigen Umsetzung von bestimmten Kohlenhydraten zu Propionat [Wood H. G. und Barden, 1977]. In der ersten

reversiblen Teilreaktion wird dabei eine CO₂-Gruppe von Methylmalonyl-CoA abgespalten (Carboxyldonor ersetzt dabei ATP und HCO₃⁻ in Reaktion (3) der Carboxylasen), Enzym-Biotin-CO₂⁻ und Propionyl-CoA entstehen. In der zweiten reversiblen Teilreaktion wird dann das Enzym-Biotin-gebundene CO₂ auf Pyruvat übertragen und Enzym-Biotin und Oxalacetat werden frei [Wood H. G. und Barden, 1977; Samols *et al.*, 1988].

Bei allen Carboxylasen werden die beiden Teilreaktionen jeweils durch getrennte Domänen katalysiert, der Biotincarboxylase- und der Carboxyltransferase-Domäne. Biotin bzw. dessen reaktive Form 1'-N-Carboxy-d-Biotin ist an der dritten Domäne, der Biotindomäne gebunden [Wood H. G. und Barden, 1977; Knowles, 1989]. Dabei dient der Biotinyllysylrest oder vielleicht auch die ganze Biotindomäne als flexibler Arm, der bei der Katalyse zwischen beiden aktiven Zentren pendelt [Samols *et al.*, 1988; Knowles, 1989; Leon-Del-Rio und Gravel, 1994]. Die Quartärstrukturen der biotintragenden Enzyme sind sehr unterschiedlich. Prokaryotische biotinabhängige Carboxylasen bestehen oft aus drei getrennten Untereinheiten, wie z.B. die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *E. coli* [Samols *et al.*, 1988]. In höheren Eukaryoten liegen jedoch häufig zwei (z.B. bei Propionyl-CoA-Carboxylasen) oder alle drei funktionellen Domänen (z.B. bei Acetyl-CoA-Carboxylasen und Pyruvatcarboxylasen) auf einer einzigen Polypeptidkette und die Enzyme bilden oft oligomere Strukturen. Es wird postuliert, dass Genfusionen während der Evolution zu dieser Entwicklung der Biotinenzyme geführt haben [Samols *et al.*, 1988; Knowles, 1989].

1.2.3.3 Konservierte Biotinbindedomäne

Die Biotindomänen der biotinabhängigen Enzyme weisen eine stabile Faltung mit hohen strukturellen Ähnlichkeiten und einigen stark konservierten Aminosäureresten auf (vgl. Abb. 4-1, Seite 122). Außerdem besitzen sie Sequenz- und Strukturhomologien zu Lipoyl-Domänen, welche auf analoge Weise posttranslational modifiziert werden [Brocklehurst und Perham, 1993; Toh *et al.*, 1993]. Wie die 3D-Strukturen der Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteine (BCCP) aus *E. coli* (Abb. 1-2) und *P. horikoshii* OT3, die Struktur der 1.3S Untereinheit der Transcarboxylase aus *P. shermanii* sowie die vorhergesagte Struktur der Biotindomäne der Pyruvatcarboxylase aus Hefe zeigen, bestehen Biotindomänen aus einem abgeflachten β -Barrel aus zwei viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern, wobei der modifizierte Lysinrest exponiert an der Spitze eines β -Turns liegt [Brocklehurst und Perham, 1993; Athappilly und Hendrickson, 1995; Yao *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Bagautdinov *et al.*, 2008].



Abb. 1-2: 3-D-Struktur der Biotindomäne von *E. coli* BCCP (PDB-Eintrag 1BDO). Die Abbildung wurde leicht verändert aus der Veröffentlichung von Athappilly und Hendrickson [1995] entnommen. Die Position des biotintragenden Lysins ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei den meisten Carboxylasen liegt der spezifische Lysinrest innerhalb einer konservierten Tetrapeptidsequenz Ala-Met-Lys-Met und ist etwa 35 Aminosäuren vom C-Terminus und etwa 39 Aminosäuren von einer Pro- X_n -Pro-Sequenz ($X_n = 1-5$ Aminosäuren) auf aminoterminaler Seite entfernt [Samols *et al.*, 1988; Leon-Del-Rio und Gravel, 1994]. Dabei ist die exakte Position des Lysinrestes für die Modifizierung durch die BPL wichtig [Reche *et al.*, 1998]. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die flankierenden Methionine nicht zwingend für die Biotinylierung von Apo-Biotindomänen erforderlich sind [Shenoy *et al.*, 1988; Leon-Del-Rio und Gravel, 1994]. Leon-Del-Rio und Gravel [1994] mutmaßen, dass die Biotinbindestelle aufgrund ihrer exponierten Lokalisation am Ende einer β -Hairpin-Schleife isoliert ist und deshalb die Faltung der restlichen Domäne und somit auch die Wechselwirkung mit der BPL nicht beeinflusst. Die Methioninreste scheinen aber eine entscheidende Rolle bei der Carboxylierungsreaktion zu spielen [Kondo *et al.*, 1984]. Nach Samols *et al.* [1988] könnten sie entweder direkt bei der Katalyse beteiligt oder nur für die richtige Orientierung des Biotins verantwortlich sein. Quantitative Biotinylierungsstudien von Polyak *et al.* [2001] widersprechen diesen Ergebnissen zum Teil. Sie unterstützen zwar die These, dass Substitutionen der Methionine keine strukturellen Effekte haben, sie können aber die Affinität der BPL zum Apoprotein herabsetzen.

Zur Funktion der Pro- X_n -Pro-Sequenz gibt es unterschiedliche Hypothesen. Zum einen könnte dies die flexible Stelle sein, welche die häufig C-terminal liegende Biotindomäne zwischen den beiden aktiven Zentren pendeln läßt [Samols *et al.*, 1988]. Andererseits sehen Leon-Del-Rio und Gravel [1994] deren Funktion eher in der Isolierung des C-Terminus vom restlichen Protein oder in der Identifizierung des Lysinrestes durch die BPL.

Auch die Rolle des C-Terminus ist nicht komplett geklärt. Bei der 1.3S Untereinheit der Transcarboxylase aus *P. shermanii* ist die vorletzte hydrophobe Aminosäure für die Biotinylierung wichtig [Murtif und Samols, 1987]. Carboxyterminale Fragmente der α -Untereinheit der menschlichen Propionyl-CoA-Carboxylase (PCCA) können dagegen ohne Aktivitätsverlust

jederzeit um bis zu drei Aminosäuren gekürzt werden, größere Deletionen sind nicht möglich. Nach Leon-Del-Rio und Gravel [1994] ist der C-terminale Bereich verschiedener Biotinenzyme reich an hydrophoben Resten, die eventuell in der Stabilisierung der Sekundärstruktur oder der Wechselwirkung mit der Ligase beteiligt sein könnten.

Schließlich gibt es noch einige konservierte Glycin-Reste, die für die Biotinylierungs- bzw. Carboxylierungsreaktion wichtig sind. Diese könnten für die BPL-Bindung oder die Faltung der Biotindomänen essentiell sein [Leon-Del-Rio und Gravel, 1994].

Für die Biotinylierung ist zwar die korrekte Faltung der Proteine wichtig [Reed und Cronan, 1991], sie erfolgt bei multimeren Proteinen jedoch unabhängig von der Assemblierung von Untereinheiten [Taroni und Rosenberg, 1991]. Außerdem können BPLs nicht nur Vollängenproteine biotinylieren, sondern auch Proteinfragmente, die eine intakte Biotindomäne mit Biotinbindestelle besitzen [Cronan, 1990]. Für eine erfolgreiche Modifizierung sind z.B. die C-terminalen 67-87 Aminosäurereste der Biotindomänen verschiedener prokaryotischer [Cronan, 1990; Chapman-Smith *et al.*, 1994] und eukaryotischer [Leon-Del-Rio und Gravel, 1994; Val *et al.*, 1995] Biotinproteine ausreichend. Stolz *et al.* [1998] konnten anhand der Biotindomäne der Oxalacetatdecarboxylase aus *Klebsiella pneumoniae* demonstrieren, dass die minimal benötigte Sequenz für eine funktionelle Biotindomäne 66 Aminosäuren umfasst, mit dem biotinylierten Lysin in der Mitte.

Es gibt andererseits kurze synthetische Peptide (mindestens 13 Aminosäuren lang), die fusioniert an Proteine vermutlich die hairpin-Struktur der natürlichen Biotindomänen nachahmen und von *E. coli* BirA *in vivo* biotinyliert werden können [Schatz, 1993]. Diese Peptide besitzen jedoch eine untypische Primärstruktur und treten in natürlich vorkommenden Proteinen nicht auf [Duval *et al.*, 1994a]. Die Interaktion dieser Peptide mit *E. coli* BirA scheint im Gegensatz zu der Wechselwirkung von BCCP mit *E. coli* BirA (BCCP kann auch von anderen BPLs modifiziert werden) spezifisch zu sein [Tissot *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2007]. Vor zwei Jahren haben Chen *et al.* [2007] ein 15 Aminosäuren langes Peptid mittels „phage display“-Verfahren aus einer Peptidbibliothek isoliert, das von *S. cerevisiae* BPL biotinyliert wird, von *E. coli* BirA aber nicht erkannt wird. Deshalb vermuten die Autoren, dass die synthetischen Peptide die entsprechenden BPLs in einer anderen Weise als die natürlichen Akzeptorproteine binden [Chen *et al.*, 2007].

1.2.3.4 Biotinproteine von *E. coli*, Hefe und Mensch

In *S. cerevisiae* gibt es sechs gut charakterisierte biotintragende Proteine, darunter fünf Carboxylasen. Zu diesen zählen zwei Isoformen der Acetyl-CoA-Carboxylase, zwei Isoformen der Pyruvatcarboxylase und die Harnstoffamidolyase.

Die dominante cytosolische Form der Acetyl-CoA-Carboxylase, Acc1p (MG 250 kDa), ist das einzige essentielle Biotinprotein der Hefe [Al-Feel *et al.*, 1992; Hasslacher *et al.*, 1993]. Sie katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und kontrolliert somit sowohl den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo* Synthese von Fettsäuren als auch deren Elongation [Schneiter *et al.*, 1996]. Ihre biologisch aktive Form ist ein Tetramer aus vier identischen multifunktionalen Untereinheiten mit je einem gebundenen Biotin [Wakil *et al.*, 1983; Cronan und Waldrop, 2002]. Der letale Phänotyp bei einem Verlust der Acc1p-Aktivität kann nicht durch die Zugabe von Fettsäuren überwunden werden, da in diesem Fall die Malonyl-CoA-abhängige Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren gestört ist. Diese sind vermutlich bei der Bildung von Kernporen essentiell [Hasslacher *et al.*, 1993; Schneiter *et al.*, 1996].

Hfa1p (MG >250 kDa), das einzige nichtcytosolische Biotinprotein in *S. cerevisiae*, ist die mitochondrielle Isoform der Acetyl-CoA-Carboxylase und ist an der mitochondriellen Fettsäure- und Liponsäuresynthese beteiligt. Ohne N-terminale mitochondrielle Lokalisationssequenz kann Hfa1p die Funktion von Acc1p ersetzen [Kearsey, 1993; Hoja *et al.*, 2004].

Die Pyruvatcarboxylasen Pyc1p [Lim *et al.*, 1988] und Pyc2p [Stucka *et al.*, 1991; Val *et al.*, 1995] (MG jeweils 130 kDa) sind in Hefe, im Gegensatz zu den Säugerproteinen, im Cytosol lokalisiert [Rohde *et al.*, 1991; Walker M. E. *et al.*, 1991]. Beide Enzyme carboxylieren Pyruvat zu Oxalacetat, der erste Reaktionsschritt der Gluconeogenese. Somit besitzen sie sowohl eine Schlüsselrolle in der Gluconeogenese als auch eine anaplerotische Funktion, indem sie Oxalacetat als Intermediat des Zitronensäurezyklus bereitstellen. Die nativen Enzyme bilden Tetramere aus vier identischen multifunktionalen Polypeptiden [Osmani *et al.*, 1985; Lim *et al.*, 1988; Pronk *et al.*, 1996]. Pyruvatcarboxylase-Doppeldeletionsmutanten können auf Glukose-Medium mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen, wenn man nicht zusätzlich Aspartat zum Auffüllen des Oxalacetat-Reservoirs zur Verfügung stellt [Stucka *et al.*, 1991].

Die Harnstoffamidolyase Dur1,2p (MG 202 kDa) ist für die Verwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle notwendig [Sumrada und Cooper, 1982; Genbauffe und Cooper, 1991]. Das Enzym besteht aus multifunktionellen Polypeptidketten mit jeweils zwei katalytischen Aktivitäten. Im ersten Katalyseschritt wird Harnstoff durch die Harnstoffcarboxylase zu Allophanat carboxyliert, das dann durch die Biotin-unabhängige Allophanathydrolase zu NH₃ und CO₂

hydrolysiert wird. Die Expression von *DURI,2* wird durch Ammoniumsulfat reprimiert [Genbauße und Cooper, 1986; Kim H. S. *et al.*, 2004].

Das tRNA-Bindeprotein Arc1p (MG 42 kDa) ist an der Aminoacylierung von tRNAs beteiligt. Es unterstützt die Assoziation der Methionin- und Glutamat-tRNA-Synthetasen mit ihren entsprechenden tRNAs und erhöht dabei die Substrataffinität und katalytische Effizienz dieser Enzyme [Simos *et al.*, 1996; Deinert *et al.*, 2001]. Arc1p wird zwar von der Bpl1p modifiziert und hat Biotin kovalent gebunden, besitzt jedoch weder die konservierte Primärstruktur der Biotinbindedomänen noch Carboxylaseaktivität. Da die Modifizierung für die Aktivität des Enzyms nicht essentiell ist, ist die funktionelle Bedeutung der Biotinylierung unklar [Kim H. S. *et al.*, 2004].

Der Mensch besitzt fünf biotinylierte Enzyme, die cytosolische Acetyl-CoA-Carboxylase ACC1 und die mitochondriellen Proteine ACC2, Pyruvatcarboxylase (PYC), Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) und 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCC) [Kim K. H., 1997; Pacheco-Alvarez *et al.*, 2002; Zemleni, 2005]. Die PCC katalysiert die Umwandlung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA, welches über Succinyl-CoA in den Zitronensäurezyklus eintritt, und ist ein Schlüsselenzym im Metabolismus ungeradzahliger Fettsäuren und mehrerer Aminosäuren. Die MCC carboxyliert 3-Methylcrotonyl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA, eine Schlüsselreaktion im Abbauweg von Leucin [Dakshinamurti und Chauhan, 1988].

In *E. coli* ist nur ein einziges biotinyliertes Enzym vorhanden, die Acetyl-CoA-Carboxylase. Die bakterielle ACC besitzt im Gegensatz zum eukaryotischen Enzym drei getrennte Untereinheiten: das biotintragende Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP), die Biotincarboxylase- und die Carboxyltransferase-Untereinheit [Wood H. G. und Barden, 1977; Li und Cronan, 1992].

1.2.4 Biotinidase und Biotinylierung von Histonen

Wie schon das Beispiel Arc1p aus Hefe zeigt [Kim H. S. *et al.*, 2004], gibt es biotinylierte bzw. biotinbindene Proteine, welche an keiner Carboxylierungsreaktion beteiligt sind. Zu diesen gehören z.B. die bakterielle Biotin-Protein-Ligase BirA [Cronan, 1989; Beckett und Matthews, 1997; Chapman-Smith und Cronan, 1999b], das Biotinspeicherprotein SBP65 aus *Pisum sativum* Samen [Duval *et al.*, 1994a] und Avidin aus Eidotter [Eakin *et al.*, 1941; White und Whitehead, 1987].

Außerdem wurde gezeigt, dass menschliche Histone biotinyliert werden können [Hymes *et al.*, 1995; Hymes und Wolf, 1999; Stanley J. S. *et al.*, 2001]. Diese Art von Histonmodifizierung scheint bei der Zellproliferation, der Transkription und der Reparatur von DNA eine Rolle zu

spielen [Kothapalli *et al.*, 2005]. Bailey *et al.* [2007] wenden jedoch ein, dass manche in den Arbeiten verwendeten Methoden, vor allem die Detektion durch Streptavidin, die Biotinylierung von Histonen nicht zuverlässig widerspiegeln und diese vermutlich nur zu einem geringen Teil modifiziert sind. Dabei ist offen, ob die HCS [Narang *et al.*, 2004] oder Biotinidase [Hymes und Wolf, 1999; Chew *et al.*, 2006] oder beide die Biotinylierung von Histonen katalysieren. Biotinidase würde dabei das Biotin von Biocytin (Biotinyllysine) auf die Histone übertragen. Für Beckett [2007] gibt es jedoch Anzeichen, dass Biotinidase in diesem Prozess nicht beteiligt ist: sie wurde weder im Kern lokalisiert [Stanley C. M. *et al.*, 2004] noch trägt sie eine Kernlokalisationssequenz [Wolf und Jensen, 2005].

Die weitaus besser verstandene Funktion von Biotinidase ist es, Biotin von biotinylierten Peptiden oder Biocytin abzuspalten und so Biotin von degradierten Biotinenzymen wiederzuverwerten. Biotinidase wird auch in den Darm sezerniert und setzt dort Biotin aus Nahrungsbestandteilen frei. Im Blutserum fungiert Biotinidase wahrscheinlich hauptsächlich als Transportprotein für Biotin, indem es Biotin kovalent als Thioester an einem Cysteinrest im aktiven Zentrum bindet [Hymes und Wolf, 1999].

In *S. cerevisiae* ist bislang keine Biotinidase identifiziert worden. Nach Ergebnissen von Stefan Ringlstetter (TU München, unveröffentlichte Daten) scheint jedoch eine Modifizierung von Histonen mit Biotin stattzufinden.

1.2.5 Biotinbiosynthese

Die Biosynthese von Biotin findet in Pflanzen, den meisten Bakterien und einigen Pilzen statt. Mit am besten untersucht ist die Biotinbiosynthese in *E. coli*, wobei die Synthesewege sich unter den Mikroorganismen ähneln [Streit und Entcheva, 2003].

Die Biosynthesegene (Abb. 1-3) liegen in *E. coli* im bidirektionalen *bio* Operon *bioABFCD*, dessen Sequenz von Otsuka *et al.* [1988] bestimmt wurde.

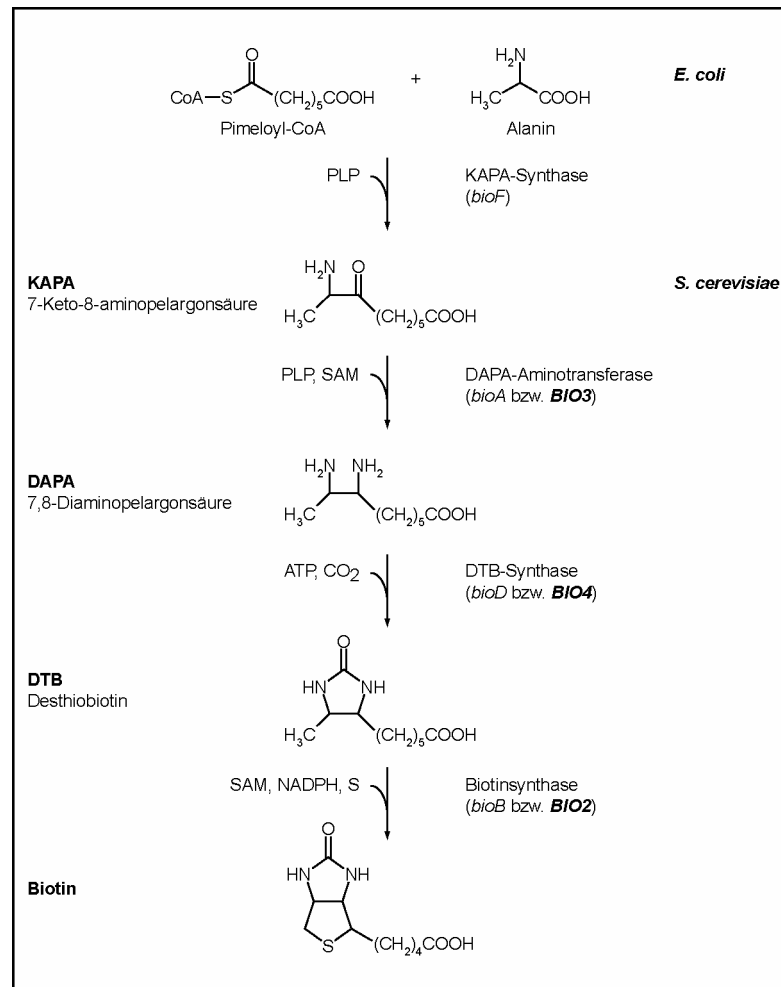


Abb. 1-3: Biotinbiosynthesewege in *E. coli* und *S. cerevisiae*. Unter den Enzymnamen sind in Klammern die entsprechenden Gennamen aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* (fett gedruckt) angegeben.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Synthese von 7-Keto-8-aminopelargonsäure (KAPA, Abb. 1-3), eine von 7-Keto-8-aminopelargonsäuresynthase (BioF) katalysierte Pyridoxalphosphat-(PLP)-abhängige Kondensation von Pimeloyl-CoA und Alanin. Der Einbau des zweiten Stickstoffs erfolgt durch die Transaminierung von KAPA zu 7,8-Diaminopelargonsäure (DAPA). Ungewöhnlicherweise ist S-Adenosylmethionin (SAM), normalerweise ein Methylgruppenüberträger, hierbei der Stickstoffdonor und wird zu S-Adenosyl-2-oxo-4-methylthiobuttersäure umgesetzt, das vermutlich weiter zu 5'-Methylthioadenosin und 2-Oxo-3-Butensäure zerfällt [Stoner und Eisenberg, 1975]. Das entsprechende PLP-abhängige Enzym heißt DAPA-Aminotransferase (BioA). Die ATP-abhängige Carboxylierung von DAPA durch die Desthiobiotinsynthase (BioD) führt zu der Bildung eines Harnstoffrings, Desthiobiotin (DTB) entsteht. Der letzte Syntheseschritt, die Einführung des Schwefels zwischen die unreaktiven Methyl- und Methylenkohlenstoffatome C-6 und C-9, wird durch das Fe-S-Cluster-Protein Biotinsynthase (BioB) in einer radikalischen Reaktion unter Beteiligung von SAM und NADPH

katalysiert [Marquet *et al.*, 2001; Schneider und Lindqvist, 2001; Streit und Entcheva, 2003; Lotierzo *et al.*, 2005]. BioB enthält ein 4Fe/4S- und ein 2Fe/2S-Cluster [Ugulava *et al.*, 2001; Berkovitch *et al.*, 2004]. Es ist allgemein anerkannt, dass das 4Fe/4S-Cluster in der aktiven Form von BioB den Elektronentransfer auf SAM übermittelt [Casper *et al.*, 2002; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2002; Jarrett, 2003]. Dabei entsteht Methionin und ein instabiles 5'-Deoxyadenosylradikal (DOA-Radikal). Dieses Radikal führt schließlich zu der homolytischen Spaltung der C-H-Bindungen an den Positionen C-6 und C-9 von DTB [Escalettes *et al.*, 1999; Layer *et al.*, 2004]. Das 2Fe/2S-Cluster scheint der Schwefeldonor zu sein [Tse Sum Bui *et al.*, 1998; Berkovitch *et al.*, 2004; Jameson *et al.*, 2004; Jarrett, 2005; Lotierzo *et al.*, 2005; Tse Sum Bui *et al.*, 2006]. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch nicht geklärt, aber es wird ein schrittweiser Mechanismus mit einem an das Enzym gebundenen, thiolierten Zwischenprodukt (9-Mercapto-DTB) postuliert [Tse Sum Bui *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2008]. Für die Aktivierung der C-6- und C-9-Atome von DTB werden zwei DOA-Radikale und somit zwei SAM-Moleküle benötigt [Escalettes *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2008]. Aufgrund von *in vitro* Experimenten wurde BioB häufig als Reaktant betrachtet, der durch die Reaktion verbraucht wird [Fontecave *et al.*, 2003; Jarrett, 2005]. *In vivo* scheint sich die Biotinsynthese jedoch als katalytisches Enzym zu verhalten und hat einen Umsatz von 20-60 Äquivalenten Biotin [Choi-Rhee und Cronan, 2005]. Nach Choi-Rhee und Cronan [2005] fördert die Katalysereaktion aber den proteolytischen Verdau von BioB. Entgegen früherer Annahmen [Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2002a; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2002b] scheint PLP bei der DTB-Synthesereaktion nicht beteiligt zu sein [Casper *et al.*, 2004; Abdel-Hamid und Cronan, 2007].

Wie bei den meisten Gram-negativen Bakterien sind die Vorläufer von Pimeloyl-CoA in *E. coli* bislang nicht bekannt. Pimeloyl-CoA wird aber durch die Gene *bioC* und *bioH* synthetisiert, wobei *bioH* außerhalb des Biotinbiosyntheseoperons liegt [O'Regan *et al.*, 1989; Streit und Entcheva, 2003].

Die meisten *S. cerevisiae*-Stämme können Biotin nicht *de novo* synthetisieren und sind somit Biotin-auxotroph [Koser, 1968]. Sie sind jedoch fähig, die letzten drei Schritte der Biotinbiosynthese zu katalysieren (vgl. Abb. 1-3) und können somit die Biotinvorläufer KAPA, DAPA und DTB verwerten [Ohsugi und Imanishi, 1985]. Die Enzyme DAPA-Aminotransferase und Desthiobiotinsynthetase werden dabei von den Genen *BIO3* und *BIO4* codiert [Phalip *et al.*, 1999]. Die Biotinsynthese ist in den Mitochondrien lokalisiert, das entsprechende Gen heißt *BIO2* [Zhang *et al.*, 1994]. Für die *in vivo*-Funktion von Bio2p sind die Proteine Isa1p und Isa2p essentiell [Mühlenhoff *et al.*, 2007]. Diese mitochondriellen Proteine sind in der Herstellung von Fe/S-Clustern involviert [Jensen und Culotta, 2000; Pelzer *et al.*, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2002] und könnten in der Regeneration des 2Fe/2S-Clusters der Biotinsynthase beteiligt sein

[Mühlenhoff *et al.*, 2007]. Biotin und die direkte Biotinvorstufe DTB werden über den Biotintransporter Vht1p (vgl. 1.2.6) aufgenommen [Stolz *et al.*, 1999; Stolz, 2003]. Die Aufnahme von DAPA und KAPA erfolgt über die hochaffine Plasmamembranpermease Bio5p, welche Ähnlichkeiten zu Aminosäurepermeasen besitzt [Phalip *et al.*, 1999]. *BIO5* bildet dabei zusammen mit *BIO3* und *BIO4* ein eng gepacktes Gen-Cluster auf Chromosom XIV [Phalip *et al.*, 1999], *BIO2* ist auf Chromosom VII lokalisiert [Zhang *et al.*, 1994].

In Sake-produzierenden *S. cerevisiae*-Stämmen und wenigen Laborstämmen wurden in den letzten Jahren zwei neue Biotinbiosynthesegene, die Gene *BIO6* und *BIO1*, entdeckt [Wu H. *et al.*, 2005; Hall und Dietrich, 2007]. Diese Stämme können Biotin *de novo* synthetisieren und sind daher Biotin-prototroph. *BIO6* und *BIO1* sind in frühen Schritten der Biosynthese (vor der KAPA-Synthese) beteiligt, wobei *BIO6* wahrscheinlich für die KAPA-Synthase [Wu H. *et al.*, 2005] und *BIO1* für die Pimeloyl-CoA-Synthase [Hall und Dietrich, 2007] codiert, und fehlen in den meisten *S. cerevisiae*-Stämmen. Da beide Gene zusammen notwendig und hinreichend für die Umwandlung eines Biotin-auxotrophen in einen Biotin-prototrophen *S. cerevisiae*-Stamm sind, könnten nun vermutlich alle Gene der Biotinbiosynthese in *S. cerevisiae* bekannt sein [Wu H. *et al.*, 2005; Hall und Dietrich, 2007]. Abgesehen von dem letzten Schritt, der durch die Bio2p katalysierte Biotinsynthese, ist der Biosyntheseweg in *S. cerevisiae* nach Hall und Dietrich [2007] durch eine Folge von Genverlust, horizontalen Gentransfer aus Prokaryoten (*BIO3* und *BIO4*), Genduplikation und anschließende Neufunktionalisierung (*BIO1* und *BIO6*) entstanden. Auch *BIO5* soll durch Genduplikation und Neufunktionalisierung hervorgegangen sein. Die *de novo* Biotinsynthese bietet wahrscheinlich gerade in Sake-Hefen einen evolutionären Vorteil, da Sake-Maische extrem wenig Biotin enthält [Wu H. *et al.*, 2005].

Säuger haben keine Biotinbiosynthese und sind deshalb auf die Aufnahme von Biotin aus der Nahrung [Pacheco-Alvarez *et al.*, 2002] bzw. auf die Resorption des im Darmtrakt bakteriell hergestellten Biotins angewiesen. Außerdem können sie mit Hilfe von Proteasen und dem Enzym Biotinidase Biotin von Biotinproteinen wiederverwerten [Hymes und Wolf, 1999].

1.2.6 Biotintransport

Die ersten Hinweise darauf, dass Bäckerhefen beim Wachstum Biotin aus dem Medium aufnehmen, stammten schon aus dem Jahr 1943 [Chang W. S. und Peterson, 1949]. Später zeigten Rogers und Lichstein [1969a; 1969b], dass intrazelluläre Biotinkonzentrationen in *S. cerevisiae* über 1000x höher als die Biotinkonzentrationen des Mediums sein können, und beschrieben einen aktiven, carrier-vermittelten und hochaffinen (apparenter $K_m = 0,3 \mu\text{M}$) Transportmechanismus.

Der Transport von Biotin ist außerdem energieabhängig, durch Glukose stimulierbar und besitzt ein pH-Optimum von pH 4 und ein Temperatur-Optimum von 30 °C. Durch Komplementation einer Fettsäure-auxotrophen Hefemutante konnten Stolz *et al.* [1999] schließlich das Gen für den Biotintransporter, *VHT1* („vitamin H transporter 1“), identifizieren. Vht1p ist ein Plasmamembranständiger H⁺-Biotin-Symporter, besitzt 12 Transmembrandomänen und ist ein Mitglied der Allantoat-Transporter-Familie, einer Unterfamilie der „Major Facilitator Superfamily“ [Marger und Saier, 1993; Nelissen *et al.*, 1997; Pao *et al.*, 1998]. Zur Allantoat-Transporter-Familie gehören acht Proteine aus *S. cerevisiae* [Nelissen *et al.*, 1997] und 12 aus *S. pombe* [Stolz, 2003], wobei nur bei etwa einem Drittel dieser Proteine die zugehörigen Substrate (Biotin [Stolz *et al.*, 1999; Stolz, 2003], Pantothersäure [Stolz und Sauer, 1999; Stolz *et al.*, 2004], Nicotinsäure [Llorente und Dujon, 2000], Allantoat und Ureidosuccinat [Chisholm *et al.*, 1987; Turoscy und Cooper, 1987] und Cystein [Kaur und Bachhawat, 2007]) bekannt sind. Die biochemischen Eigenschaften von Vht1p ähneln denen des Biotintransporters aus *S. pombe* (*vht1*⁺), die Primärstruktur der beiden Proteine ist jedoch recht unterschiedlich [Stolz, 2003]. Abgesehen von dem Transport von DTB [Rogers und Lichstein, 1969b; Stolz, 2003; Mühlenhoff *et al.*, 2007] ist Vht1p spezifisch für den Transport von Biotin, kann aber durch Biotinyl-*p*-nitrophenylester, Protonophore oder manche Biotinanaloga inhibiert werden [Rogers und Lichstein, 1969b; Becker *et al.*, 1971; Stolz *et al.*, 1999]. *vht1Δ*-Mutanten sind bei Biotinaußenkonzentrationen von über 200 µg/l lebensfähig. Ob die Aufnahme bei diesen hohen Außenkonzentrationen passiv erfolgt, oder durch die Aktivität eines weiteren Transporters begünstigt wird, ist nicht bekannt.

SMVT („sodium-dependent multivitamin transporter“) ist das Biotintransportprotein in Säugerzellen. Es ist ein Na⁺-Biotin-Symporter, dessen *K_m*-Werte zwischen 8 und 15 µM angegeben werden, und gehört zu der Na⁺-abhängigen Glukosetransporterfamilie [Prasad *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1999; Wang H. *et al.*, 1999]. SMVT besitzt keine strukturelle Ähnlichkeit zum Biotintransporter aus *S. cerevisiae* [Stolz *et al.*, 1999] und kann im Gegensatz zu letzterem neben Biotin auch die Vitamine Pantothersäure und Lipoat importieren [Grassl, 1992a, b; Prasad *et al.*, 1997], was durch spätere Studien eindeutig bestätigt wurde [Prasad *et al.*, 1999; Wang H. *et al.*, 1999]. Die Elektrogenizität des Vitamintransports durch SMVT war lange Zeit umstritten. Der Transport ist aber vermutlich mit einer Stöchiometrie Na⁺:Vitamin von 2:1 elektrogen und wird sowohl durch einen Na⁺-Gradienten als auch durch ein negatives Membranpotential stimuliert [Grassl, 1992b; Prasad *et al.*, 1999; Wang H. *et al.*, 1999]. Neben dem aktiven Transport von Biotin scheint eine passive Aufnahme von Biotin möglich [Prasad *et al.*, 1998; Zemleni, 2005]. Außerdem gibt es Hinweise auf die Existenz weiterer Biotintransporter und auf eine Aufnahme von Biotin durch den Monocarboxylattransporter 1 (MCT1) [Zemleni, 2005].

Obwohl die meisten Bakterien Biotin-prototroph sind, verfügen sie dennoch über Biotinaufnahmesysteme. Der Biotintransportmechanismus ist zwar noch nicht gänzlich geklärt, die Gene *bioY*, *bioM*, *bioN*, *ecfA* und *ecfT* sind aber gute Kandidaten für Biotintransporter in Gram⁺ Bakterien und manchen Archaeen [Entcheva *et al.*, 2002; Guillen-Navarro *et al.*, 2005a]. BioY besitzt mit sechs möglichen Transmembrandomänen eine typische Eigenschaft von prokaryotischen Transportern [Rodionov *et al.*, 2002] und liegt im Komplex mit BioMN bzw. EcfAA'T, Proteinen mit Ähnlichkeiten zu ABC-Transportern, vor [Entcheva *et al.*, 2002; Guillen-Navarro *et al.*, 2005a]. Nach Hebbeln *et al.* [2007] ist BioY ein Biotintransporter mit hoher Kapazität, der in Verbindung mit BioMN zu einem Transportsystem mit hoher Affinität wird.

Die Biotintransporter in Gram⁻ Bakterien sind nicht bekannt. Der Biotintransport von *E. coli* ist aber sehr gut biochemisch untersucht. Schon vor über 30 Jahren wurde in *E. coli* ein aktiver, energieabhängiger, durch Glukose stimulierbarer und durch Biotinanaloga inhibierbarer Transport von Biotin nachgewiesen [Prakash und Eisenberg, 1974]. Der K_m -Wert ist mit 0,27 μM [Piffeteau und Gaudry, 1985] vergleichbar mit dem des Biotintransporters aus Bäckerhefe. Außerdem ist *E. coli* durch dieses System die Aufnahme von bis zu 31 Aminosäuren langen, biotinylierten Peptiden möglich [Walker J. R. und Altman, 2005]. Die Gene für den Biotintransporter wurden allerdings bislang nicht identifiziert. Obwohl *bioY* in den Genomen vom Gram⁺ Bakterien und Archaeen weit verbreitet ist, ist es in *E. coli* nicht vorhanden [Hebbeln *et al.*, 2007].

Auch bei Pflanzen, die eine zu *E. coli* ähnliche Biotinbiosynthese besitzen [Alban *et al.*, 2000; Rebeille *et al.*, 2007], wurde der Transport von Biotin nachgewiesen. So wurde z.B. von Ludwig *et al.* [2000] gezeigt, dass AtSUC5 und vermutlich auch weitere pflanzliche Saccharosetransporter aus *Arabidopsis thaliana* Saccharose/Biotin-H⁺-Symporter sind.

1.2.7 Biotinabhängige Regulation der Genexpression

Eine biotinregulierte Expression von Genen ist in Prokaryoten und Eukaryoten weit verbreitet. So finden sich Biotin-kontrollierte Gene sowohl in biotinauxotrophen (z.B. Hefen und Säugern) als auch biotinprototrophen (Pflanzen, Bakterien) Organismen [Rodionov *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2003; Rodriguez-Melendez und Zemleni, 2003].

Am besten ist die biotinabhängige Regulation der Genexpression in *E. coli* charakterisiert. Die Regulation wird hier auf der Transkriptionsebene über die bifunktionelle Biotin-Protein-Ligase BirA („Bir“ steht für „biotin regulation“) vermittelt [Barker und Campbell, 1980, 1981a, b; Eisenberg *et al.*, 1982]. BirA katalysiert demnach nicht nur die Carboxylierung von BCCP, dem einzigen Biotinakzeptor in *E. coli*, sondern reprimiert auch die Initiation der Transkription der

Biotinbiosynthesegene durch direkte Bindung an die Promotorregion des bidirektionalen Biotinbiosyntheseoperons (vgl. Abb. 1-4). Die Bindung erfolgt dabei an einen 40 bp Biotinoperator, welcher beide Promotoren partiell überlappt und ein unperfektes, invertiertes Palindrom darstellt [Otsuka A. und Abelson, 1978; Beckett, 2007]. Biotinyl-5'-AMP wirkt als Corepressor der Biotinregulation, indem es, gebunden an BirA, die BirA-Operator-Wechselwirkung verstärkt [Prakash und Eisenberg, 1979]. Die Funktion von BirA wird durch die Konzentration an unbiotinyliertem Apo-BCCP bestimmt (vgl. Abb. 1-4) [Cronan, 1988; Streaker und Beckett, 2006b; Beckett, 2007]. Besteht ein Mangel an Apo-BCCP, häuft sich die aktivierte Form von BirA, der Biotinyl-5'-AMP-Enzymkomplex, in der Zelle an, dimerisiert, bindet an die Operator-DNA und reprimiert die Transkription der Biosynthesegene. Der stabile Holo-BirA-Komplex ist nach Xu und Beckett [1994] die hauptsächlich vorkommende Enzymform in der Zelle. Bei Akkumulation von Apo-BCCP (durch Biotinmangel oder verstärkte BCCP-Expression) interagiert Apo-BCCP mit dem Holo-BirA-Komplex. Biotin wird dabei auf BCCP übertragen und die Dimerisierung und DNA-Bindung von BirA verhindert.

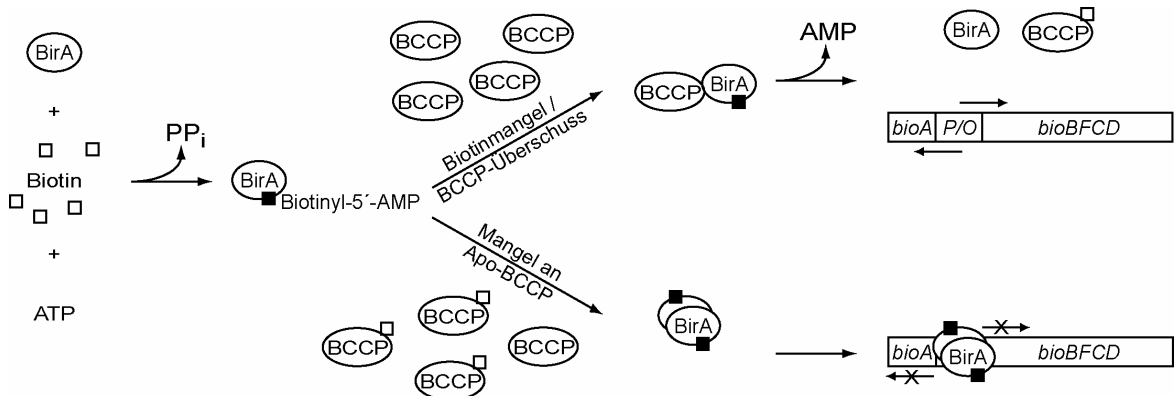


Abb. 1-4: Biotinabhängige Regulation des Biotinbiosyntheseoperons in *E. coli*. Bei hoher Apo-BCCP-Konzentration überträgt der aktive Holo-BirA-Komplex (Biotinyl-5'-AMP-BirA-Komplex) Biotin auf Apo-BCCP, Holo-BCCP entsteht und der Operator der Biotinbiosynthesegene ist frei. Ist die Konzentration von unbiotinyliertem BCCP gering, dimerisiert das Holo-BirA-Enzym, bindet an die Biotinoperatorstelle und inhibiert die Expression der Biotinbiosynthesegene.

E. coli BirA besteht aus drei Domänen [Wilson *et al.*, 1992]. Die N-terminale Domäne ist an der DNA-Bindung beteiligt und besitzt ein typisches Helix-turn-Helix-DNA-Bindemotiv. Der zentrale Part ist für die Biotinligation wichtig und trägt in einem seiner Loops die GRGRRG-Sequenz, welche in allen BPLs konserviert ist. Der aus einem β -Faltblatt bestehenden C-terminalen Domäne konnte bislang keine Funktion zugeordnet werden [Beckett und Matthews, 1997; Streit und Entcheva, 2003].

Weiterhin ist bekannt, dass das Biotintransportsystem in *E. coli* bei Wachstum in biotinhaltigem Medium reprimiert wird. Dabei wird aber eventuell ein von der Kontrolle der Biotinbiosynthesegene unabhängiger Regulationsweg genutzt [Prakash und Eisenberg, 1974;

Piffeteau und Gaudry, 1985]. Weder das Transportergen noch der Regulationsmechanismus wurden jedoch bislang beschrieben.

Die biotinabhängige Regulation der Transkription von Biotingenen (Gene der Biotinbiosynthese und des Biotintransports) ist in Mikroorganismen weit verbreitet. Das Regulationsprinzip aus *E. coli* ist in einem breiten Spektrum von Eubakterien und Archaeobakterien zu finden und die Biotinoperatorsequenzen von Biotingenen sind stark konserviert [Rodionov *et al.*, 2002; Beckett, 2007]. Beispielsweise konnte auch die Bifunktionalität der BPL aus *B. subtilis* gezeigt werden [Bower *et al.*, 1995; Bower *et al.*, 1996]. Das legt nahe, dass sich dieser Mechanismus sehr früh entwickelt hat [Beckett, 2007]. Es gibt aber auch Mikroorganismen, bei denen die DNA-Bindefunktion fehlt. Hier ist offenbar jeweils mindestens ein weiteres BPL-unabhängiges Protein in der Biotinregulation beteiligt, wie z.B. BioR in α -Proteobakterien [Heinz *et al.*, 1999; Guillen-Navarro *et al.*, 2005b; Rodionov und Gelfand, 2006; Beckett, 2007]. Es sind aber weder der Kontrollmechanismus noch die Rolle der BPL in der Regulation bekannt.

In Säugern hat Biotin Einfluss auf Zellsignalwege, Genexpression und Chromatinstruktur [Rodriguez-Melendez und Zemleni, 2003; Zemleni, 2005]. Schon vor fast 40 Jahren zeigten Dakshinamurti und Mitarbeiter in ihren Pionierarbeiten, dass Biotin in Säugern nicht nur eine klassische Rolle als Coenzym von Carboxylasen besitzt, sondern auch die Genexpression von Glukokinase verändert [Dakshinamurti und Cheah-Tan, 1968a, b; Dakshinamurti und Litvak, 1970]. Mittlerweile wurden auch einige andere biotinkontrollierte Gene gefunden. Mit *HCS*, *SMVT* und Genen von Biotincarboxylasen sind darunter einige Gene aus dem Biotinmetabolismus. Außerdem werden z.B. noch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, die Ornithintranscarbamoylase, Cytokine und Onkogene durch Biotin reguliert [Rodriguez-Melendez und Zemleni, 2003]. Wie verschiedene DNA Mikroarray-Studien belegen, gibt es in Säugern insgesamt etwa 2000 biotinregulierte Gene, die zum Teil in Genclustern vorkommen [Wiedmann *et al.*, 2003; Wiedmann *et al.*, 2004; Zemleni, 2005; Rodriguez-Melendez *et al.*, 2006]. Nach dem Modell von Solorzano-Vargas *et al.* [2002] spielt Biotinyl-AMP eine essentielle Rolle in der Genregulation (vgl. Abb. 1-5). Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Biotinyl-AMP führt zu einer vermehrten Synthese von cGMP und damit zu einer Stimulierung der Proteinkinase G. Als Folge werden Proteine, welche die Transkription der Gene von *HCS* und Biotin-Carboxylasen steigern, phosphoryliert und aktiviert. Bei Biotinmangel oder verminderter *HCS*-Aktivität wird eine solche Transkriptionsaktivierung inhibiert. Ob auch neben den Genen des Biotinmetabolismus weitere Gene durch Biotinyl-AMP reguliert werden, ist allerdings nicht geklärt [Zemleni, 2005].

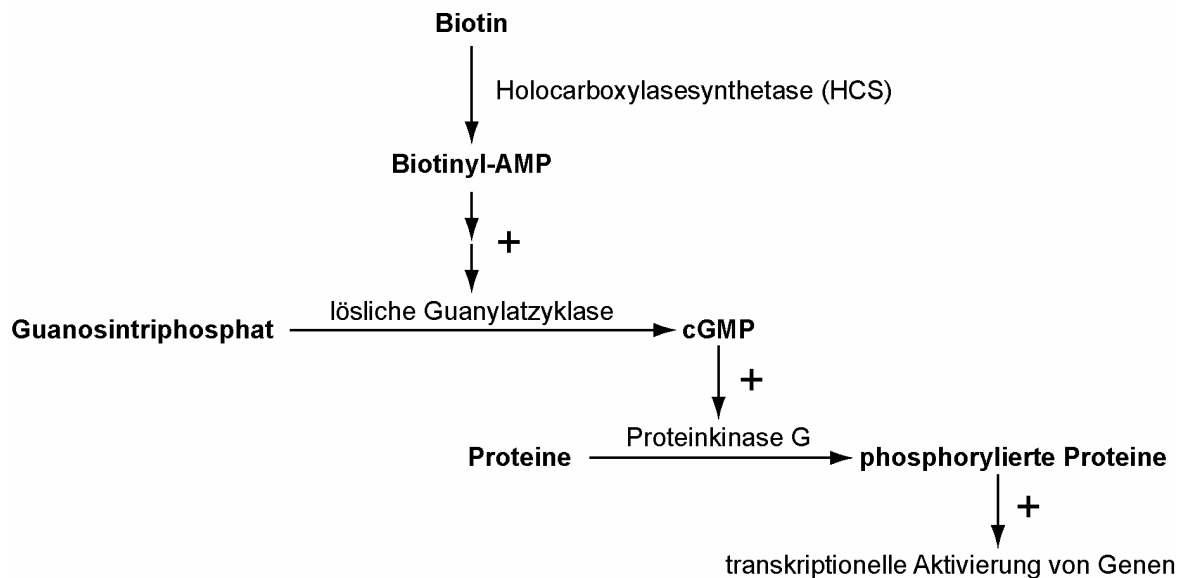


Abb. 1-5: Biotinyl-AMP-abhängige Regulation der Genexpression in Säugern (nach [Rodriguez-Melendez und Zempleni, 2003]) „+“ bedeutet eine Aktivierung des entsprechenden Signalwegs.

Neben Biotinyl-AMP gibt es jedoch noch weitere Signalwege, durch die eine biotinabhängige Expression von Genen übermittelt werden kann. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor NF- κ B, die Mitglieder der Sp/Krüppel-like factor (KLF)-Familie SP1 und SP3 und Rezeptortyrosinkinasen [Rodriguez-Melendez und Zempleni, 2003; Zempleni, 2005]. Außerdem greift die Biotinylierung von Histonen in mehrere biologische Prozesse ein. Bei der Proliferation von Zellen werden Histone verstärkt biotinyliert und es gibt Hinweise, dass die Histonbiotinylierung häufiger in DNA-Regionen vorkommt, welche nicht transkriptionsaktiv sind. Biotinylierte Histone spielen zudem vermutlich eine Rolle bei der DNA-Reperatur [Rodriguez-Melendez und Zempleni, 2003; Zempleni, 2005].

Interessanterweise führt starker Biotinmangel zu erheblichen Störungen im Zentralnervensystem. Bei gemäßigttem Biotinmangel wird dort jedoch eine normale Biotinkonzentration zu Lasten anderer Gewebe aufrechterhalten. Dazu wird die Expression von *SMVT* und *HCS* in Rattenleber reprimiert, die Expression der Gene im Gehirn bleibt stabil [Pacheco-Alvarez *et al.*, 2004]. Reidling *et al.* [2007] konnten zeigen, dass im menschlichen Darmtrakt die *SMVT*-Expression bei Biotinmangel erhöht ist und die Aktivierung des *SMVT*-Promotors vielleicht über den Krüppel-like-Faktor KLF-4 stattfindet. Biotinabhängige Effekte sind offenbar zell- bzw. gewebespezifisch. Eine Rolle in der Biotinregulation spielen auch Biotinanaloga (z.B. Diaminobiotin und Desthiobiotin) [Rodriguez-Melendez *et al.*, 2003] und Biotinkatabolite (z.B. Bisnorbiotin) [Rodriguez-Melendez *et al.*, 2006], welche bei Säugern in Zellen und Körperflüssigkeiten insgesamt etwa in der gleichen Konzentration vorliegen wie intaktes Biotin [Mock *et al.*, 1993;

Mock *et al.*, 1995]. Da Biotinanaloga wie DTB nicht zu AMP-Estern umgesetzt werden können und auch nicht mit Biotin um die Bindung an HCS kompetieren, kann deren Einfluss auf die Zellen nicht durch das Biotinyl-AMP-Regulationsmodell erklärt werden [Zempleni, 2005]. Auch die Regulationsmechanismen für posttranskriptionale Effekte von Biotin sind nicht bekannt [Rodriguez-Melendez und Zempleni, 2003; Zempleni, 2005].

In Hefe findet ebenfalls eine biotinabhängige Genregulation statt. Schon Rogers und Lichstein [1969a] konnten zeigen, dass die Synthese des Biotintransportsystems und damit die Aufnahmerate von Biotin invers mit der Biotinkonzentration des Mediums korreliert. Durch die Identifizierung und Charakterisierung des Vitamintransportproteins Vht1p in *S. cerevisiae* durch Stolz *et al.* [1999] wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die Biotinaufnahme wird vermutlich ausschließlich auf der Transkriptionsebene reguliert, indem die Transkription des Transportergens *VHT1* in Niedrig-Biotinmedium gesteigert wird [Stolz *et al.*, 1999]. Die gleiche Situation wurde auch in *S. pombe* mit *vht1*⁺ als Biotintransportergen demonstriert [Stolz, 2003].

Durch die genomweite Expressionsstudie in *S. cerevisiae* durch Wodicka *et al.* [1997] gab es erste Hinweise, dass auch Biotinbiosynthesegene in Hefe stark reguliert werden. Neben der *VHT1*-mRNA waren hier die mRNA-Mengen von *BIO3*, *BIO4* und *BIO5* nach Anzucht der Zellen in Minimalmedium deutlich höher als nach Anzucht der Zellen in Vollmedium, das größere Mengen an Biotin enthält. In Vollmedium war *BIO5*-mRNA nicht detektierbar. Außerdem wurde die Biotinoperatorsequenz aus *E. coli* auch in der Promotorregion von *S. cerevisiae* *BIO3-BIO4*, allerdings geteilt auf vier Sequenzstücke, gefunden [Phalip *et al.*, 1999]. Wie bei einigen prokaryotischen BPLs (vgl. Seite 20) fehlt aber bei *S. cerevisiae* Bpl1p und allen anderen eukaryotischen BPL-Proteinen die N-terminale DNA-Bindungsdomäne aus *E. coli* [Tissot *et al.*, 1997; Chapman-Smith und Cronan, 1999a; Polyak *et al.*, 1999]. Aus diesem Grund besitzen diese Organismen andere, bislang noch nicht oder nicht vollständig charakterisierte Mechanismen für die Erkennung der Biotinverfügbarkeit. Ob und inwieweit die BPLs hierbei eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden.

1.2.8 Biotechnologische Anwendungen

Biotin findet als Reagenz großen Nutzen in der Biotechnologie, Biochemie, Immunologie und Zellbiologie. Heterologe Biotindomänen werden dabei effektiv zur Markierung von Proteinen für die Proteinreinigung, die Lokalisation, den Nachweis und die Immobilisierung von Proteinen eingesetzt [Wilchek und Bayer, 1988]. Die Verwendung von Biotindomänen-Fusionsproteinen hat mehrere Vorteile. Zum einen lassen sich relativ kleine, stabile Biotindomänen verwenden, die von

heterologen BPLs erkannt werden und bei nachfolgenden Anwendungen (Antikörperentwicklung, Charakterisierung der Proteine) nicht stören [Caspari *et al.*, 1996; Stolz *et al.*, 1998]. Außerdem sind Biotindomänen membrangängig, so dass jederzeit auch sekretorische oder membranständige Proteine markiert werden können [Reed und Cronan, 1991; Taroni und Rosenberg, 1991; Ackerman *et al.*, 1992; Jander *et al.*, 1996]. Biotindomänen können intern oder am C- bzw. N-terminalen Ende der Proteine fusioniert werden und es gibt nur wenige natürliche biotinylierte Proteine, die eine Anwendung behindern könnten [Cronan, 1990; Consler *et al.*, 1993]. Schließlich erfolgt die *in vivo* Biotinylierung, im Gegensatz zu chemischen *in vitro* Markierungen mittels Quervernetzern, spezifisch und ohne vorherige Reinigung des Proteins [Parrott und Barry, 2000]. Für die Detektion und Reinigung der Fusionsproteine sind polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Biotin kommerziell erhältlich, oder man nutzt radioaktiv markiertes Biotin als sensitive und einfache Detektionsmöglichkeit [Cronan, 1990]. Eine gute und oft genutzte Alternative ist die Verwendung von Avidin bzw. Streptavidin [Wilchek und Bayer, 1988; Diamandis und Christopoulos, 1991]. Avidin ist ein tetrameres basisches Glykoprotein mit vier identischen Untereinheiten und kommt im Eiweiß und Ovidukten vieler Vogelarten vor. Es bindet Biotin spezifisch und nahezu irreversibel ($K_D = 10^{-15}$ M), mit 4 Mol Biotin pro Mol Avidin [Gope *et al.*, 1987; Green, 1990]. Nachteile des Avidins sind seine Kohlenhydratgruppen und sein hoher isoelektrischer Punkt, Eigenschaften die oft zu unspezifischer Bindung führen [Wilchek und Bayer, 1988; Diamandis und Christopoulos, 1991]. Die Kohlenhydratketten können z.B. mit zuckerbindenden Proteinen an Zelloberflächen wechselwirken [Wilchek und Bayer, 1988]. Beide Probleme werden durch die Verwendung von bakteriellen Streptavidin umgangen. Streptavidin wird aus mehreren *Streptomyces*-Arten isoliert und hat eine ähnlich hohe Affinität zu Biotin wie Avidin [Chalet und Wolf, 1964; Green, 1990]. Um Proteine in nativer Form reinigen zu können, werden modifizierte Avidin- bzw. Streptavidin-Formen mit geringerer Affinität zu Biotin verwendet [Cronan, 1990].

In dieser Arbeit wird Streptavidin, konjugiert mit Peroxidase, zur Detektion der hefeeigenen Biotinproteine mittels Western Blot-Analyse (vgl. Kapitel 2.2.3.3) und im ELISA-Test zur Bestimmung von Biotin (vgl. Kapitel 2.2.4) eingesetzt.

1.3 Zielsetzung

Saccharomyces cerevisiae kann sich an eine veränderte Verfügbarkeit von Biotin anpassen. So konnten schon Rogers und Lichstein [1969a; Rogers und Lichstein, 1969b] zeigen, dass Bäckerhefe Biotin aktiv importiert und dass die Aufnahmeraten invers mit der Biotinkonzentration im Medium korrelieren. Dreißig Jahre später wurde durch Stolz *et al.* [1999] der Biotintransporter Vht1p charakterisiert und die biotinabhängige Regulation der *VHT1*-Expression mittels Biotinaufnahmetests sowie einer Northern Blot-Analyse belegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wahrnehmung von Biotinmangel und die daraus resultierende Genregulation in *Saccharomyces cerevisiae* weiter aufzuklären. Dazu wurde zum einen eine konservierte Promotorsequenz gesucht, die als UAS_{BIO} für eine Promotoraktivierung von *VHT1* und eventuell anderer durch Biotinmangel induzierter Gene nötig ist und somit eine mutmaßliche Transkriptionsfaktorbindestelle darstellt.

Zum anderen sollten Mitglieder der Signalkette zur Wahrnehmung des Biotinstatus der Zelle identifiziert werden. Zunächst wurde dazu geprüft, ob die einzelnen Proteine aus dem Biotinmetabolismus eine Rolle bei der Biotinwahrnehmung spielen.

Schließlich sollte durch EMS-Mutagenese eines Reporterstammes sowie Transformation einer Genbank in einen Reporterstamm Klone gesucht werden, die eine veränderte Biotinwahrnehmung besitzen. Diese Klone sollten zur weiteren Charakterisierung des Biotinregulationssystems genutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

E. coli - Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>F⁻, λ, endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, deoR, Φ80dlacZΔM15</i>	[Hanahan, 1983]
XL1-blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

S. cerevisiae - Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112</i>	[Thomas und Rothstein, 1989]
W303-1A U	<i>MATa, ade2-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, URA3</i>	Christian Vogl
W303-1B U	<i>MATα, ade2-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, URA3</i>	Christian Vogl
VHT1-3HA	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, VHT1-3HA (his5⁺)</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
BIO5-9Myc	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, BIO5-9Myc (kanMX4)</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
PYC1-3HA	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, PYC1-3HA (his5⁺)</i>	diese Arbeit*
PYC2-9Myc	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, PYC2-9Myc (kanMX4)</i>	diese Arbeit*
vht1 Δ	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, vht1Δ::HIS3</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
GAL-BPL1	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, GAL1prom-BPL1 (kanMX4)</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
GAL-ACC1	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, GAL1prom-ACC1 (kanMX4)</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
pyc1	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2</i>	[Stucka et al., 1991]
pyc2	<i>MATα, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc2::URA3</i>	[Stucka et al., 1991]
pyc1 pyc2	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2, pyc2::URA3</i>	[Stucka et al., 1991]
pyc2 Δ	<i>MATα, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc2Δ::kanMX4</i>	[Pirner und Stolz, 2006]
pyc1 pyc2 Δ	<i>MATα, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2, pyc2Δ::kanMX4</i>	diese Arbeit*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>pyc1</i> <i>pyc2Δ vht1Δ</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2, pyc2Δ::kanMX4, vht1Δ::HIS3</i>	diese Arbeit*
<i>pyc1</i> <i>PYC2-9Myc</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2, PYC2-9Myc (kanMX4)</i>	diese Arbeit*
<i>pyc1</i> <i>pyc2^{K/R}-9Myc</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc1::LEU2, pyc2(A3407G)-9Myc (kanMX4)</i>	diese Arbeit*
<i>pyc2</i> <i>PYC1-3HA</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc2::URA3, PYC1-3HA (his5⁺)</i>	diese Arbeit*
<i>pyc2 pyc1^{K/R}-3HA</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, pyc2::URA3, pyc1(A3404G)-3HA (his5⁺)</i>	diese Arbeit*
W303-1A VPA- <i>HIS3</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2::YIpMELβ2-Fragment A-HIS3-LEU2</i>	diese Arbeit*
<i>tis11Δ</i>	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, tis11Δ::kanMX4</i>	diese Arbeit*
BY4742 (WT)	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0</i>	[Brachmann <i>et al.</i> , 1998]
BY4741 <i>pyc1Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, met15Δ0, pyc1Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 <i>pyc2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, pyc2Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 <i>tis11Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, tis11Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>bio2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, bio2Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>bio3Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, bio3Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>bio4Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, bio4Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>hfa1Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, hfa1Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>dur1,2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, dur1,2Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>arc1Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, arc1Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>bpl1-3826</i>	<i>MATa ura3 bpl1 (ts)</i>	[Mishina <i>et al.</i> , 1980; Hoja <i>et al.</i> , 1998]

Hinweise:

- Die Mutanten sind jeweils unter ihren isogenen WT-Stämmen aufgeführt.
- *: Herstellung vgl. Kapitel 2.2.2.14
- Die in dieser Arbeit erzeugten BHB-Klone sind im Ergebnisteil (vgl. Kapitel 3.3.1) dokumentiert.

2.1.2 Plasmide und Genbank

2.1.2.1 *E. coli* Vektoren

Name	Beschreibung	Referenz
pUC18/19	<i>ori, bla, lacZα</i>	[Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985]
pUC19- <i>LEU2</i> (O II)	<i>XhoI-SalI</i> Fragment von <i>LEU2</i> (<i>S. c.</i>), kloniert in <i>SalI</i> von pUC19; Orientierung: <i>SalI</i> bleibt am <i>BanII</i> Ende der MCS	Jürgen Stolz
pPCR-Script Amp SK(+)	<i>pUC ori, fl(+)</i> <i>ori, Amp^R, P-lac, lacZ'</i> blunt-Klonierung von PCR-Fragmenten in <i>SrfI</i> -Schnittstelle	Stratagene

2.1.2.2 *E. coli* – *S. cerevisiae* Shuttle- Vektoren

Name	Beschreibung	Referenz
YCplac33	<i>ori, CEN, Amp^R, URA3</i>	[Gietz und Sugino, 1988]
YCplac22	<i>ori, CEN, Amp^R, TRP1</i>	[Gietz und Sugino, 1988]
YEplac195	<i>ori, 2μ, Amp^R, URA3</i>	[Gietz und Sugino, 1988]
YEp352	<i>ori, 2μ, Amp^R, URA3, lacZ</i>	[Hill J. E. <i>et al.</i> , 1986b]
pRS313	<i>ori, CEN, Amp^R, HIS3</i>	[Sikorski und Hieter, 1989]
pMEL β 2	<i>CEN, Amp^R, URA3, MEL1</i> -Promotor-(w/o UAS)- <i>lacZ</i> -Fusion in pRS316	[Melcher <i>et al.</i> , 2000]
YIpMEL β 2	pMEL β 2 w/o <i>CEN/ARS</i>	[Melcher <i>et al.</i> , 2000]
<i>VHT1-lacZ</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment (ab natürlicher <i>HindIII</i> -Schnittstelle bei bp -760) fusioniert mit <i>E. coli lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
YCplac22- <i>VHT1-lacZ</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment (ab natürlicher <i>HindIII</i> -Schnittstelle bei bp -760) fusioniert mit <i>lacZ</i> in YCplac22	Jürgen Stolz
<i>VHT1</i> (w/o BRE)- <i>lacZ</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment w/o BRE fusioniert mit <i>lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
<i>VHT1</i> (w/o Gcn4)- <i>lacZ</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment w/o Gcn4 fusioniert mit <i>lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
<i>VHT1</i> (w/o Aft1)- <i>lacZ</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment w/o Aft1 fusioniert mit <i>lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
<i>BIO2-lacZ</i>	<i>BIO2</i> -Promotor PCR-Fragment (1000 bp) fusioniert mit <i>E. coli lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
<i>BIO2</i> (w/o BRE)- <i>lacZ</i>	<i>BIO2</i> -Promotorfragment w/o BRE fusioniert mit <i>lacZ</i> in YCplac33	[Pirner und Stolz, 2006]
<i>VHT1-HIS3</i>	<i>VHT1</i> -Promotorfragment (ab natürlicher <i>HindIII</i> -Schnittstelle bei bp -760) fusioniert mit <i>HIS3</i> in YCplac33	Jürgen Stolz
YCplac33- <i>VHT1</i>	<i>VHT1</i> in YCplac33	diese Arbeit*

Name	Beschreibung	Referenz
YEp352- <i>VHT1</i>	<i>Sau3A</i> -Genbankfragment (VII 621595-617627) in <i>Bam</i> HI von YEp352	Petra Reihl
pCA21- <i>BPL1</i>	<i>BPL1</i> in YCplac33	Jürgen Stolz
pMELβ2-Fragment A	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -356 bis -223) in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
pMELβ2-Fragment B	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -356 bis -226) w/o BRE in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
pMELβ2-Fragment C	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -305 bis -226) in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
pMELβ2-Fragment D	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -286 bis -223) in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
pMELβ2-Fragment E	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -286 bis -223) w/o BRE in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
pMELβ2-Fragment F	<i>VHT1</i> -Promotor PCR-Fragment (bp -356 bis -267) in pMELβ2	[Pirner und Stolz, 2006]
YIpMELβ2-Fragment A- <i>HIS3-LEU2</i>	<i>VHT1</i> -Fragment (bp -356 bis -223) in <i>MEL1</i> -Promotor-(w/o UAS) fusioniert mit <i>HIS3</i> in YIpMELβ2 (Selektionsmarker <i>LEU2</i>)	diese Arbeit*
p3HAT- <i>his5</i>	Klonierungsvektor mit 3x HA-Epitop und <i>his5</i> -Kassette	Jürgen Stolz
p9MycT- <i>kanMX</i>	Klonierungsvektor mit 9x Myc-Epitop und <i>kanMX</i> -Kassette	Jürgen Stolz

*: Klonierung vgl. Kapitel 2.2.2.15

2.1.2.3 Genbank

Genbank aus *S. cerevisiae* 45-C3 in YEp352 (2μ, *URA3*, *Amp^R*) [te Heesen *et al.*, 1993]: Genomische DNA aus dem *S. cerevisiae*-Stamm 45-C3 (*Δwbp1::HIS3*, *URA3::Gall-WBP1*, *ade2-101*, *tyr1*, *his3Δ200*) [te Heesen *et al.*, 1992] wurde partiell mit *Sau3A* verdaut. Die 4-10 kb großen Fragmente wurden isoliert und in den *Bam*HI geschnittenen Vektor YEp352 [Hill J. E. *et al.*, 1986b] ligiert.

2.1.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
HP6	GGAGACATCAACACTAAGTTTCTACC	pMELβ2, bp -39 bis -14, 5' der <i>Eco</i> RI-Sequenz
HP7	ATATCTCGAGATAATCTCAGAGCCA TTTCGGGTG	<i>VHT1</i> , bp -267 bis -290, mit <i>Xho</i> I-Schnittstelle
HP10	ATATGTCGACGAAATGGCTCTGAGA TTATGAATC	<i>VHT1</i> , bp -286 bis -262, mit <i>Sal</i> I-Schnittstelle
HP12	ATATGTCGACGCCTCCATTGCTACA ATTGC	<i>VHT1</i> , bp -356 bis -337, mit <i>Sal</i> I-Schnittstelle
HP13	ATATCTCGAGGCGGTACGGCGCTTT C	<i>VHT1</i> , bp -223 bis -241, mit <i>Xho</i> I-Schnittstelle
HP15	ATATGCATGCCGTCGTTGCTTTTAT TACCG	pMELβ2, bp -7 bis -26, 5' der <i>Bam</i> HI-Sequenz, mit <i>Sph</i> I-Schnittstelle

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
HP16	ATTCCCGAATTGGGAAGC	pMELβ2, bp -14 bis +4, 5' der <i>HindIII</i> -Sequenz
HP17	ATATAAGCTTAGTGCCGAATGATTGAGAATTTGAC	<i>TIS11</i> , bp +1134 bis +1109 (Terminator), mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
HP18	TATATCTAGATTCTGCCTAGCCCATTTGCG	<i>TIS11</i> , bp -349 bis -329, mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle
HP19	AAGCTGTTTCAGCGCCGAGC	<i>TIS11</i> , bp +1233 bis +1215 (Terminator)
HP20	CCTCCAATTGTGTGTACCGTTTCG	<i>TIS11</i> , bp -423 bis -401
HP21	ATATCTGCAGTGCAGATTTTGGGAATGGC	<i>VHT1</i> , bp -110 bis -129, mit <i>PstI</i> -Schnittstelle
HP22	ATACTGCAGTTACGGCTATAACATAACTATATATAAAGGC	<i>VHT1</i> , bp -103 bis -73, mit <i>PstI</i> -Schnittstelle
HP23	GGGCGCTGGAATGGTCTAAG	<i>PYC2</i> , bp +3851 bis +3832 (Terminator)
HP24	TGTTAAGTAAGAAGTACTCCCCATCGG	<i>PYC2</i> , bp -255 bis -229
HP27	TGATTTATTAGTTCTATTAGAAGACCAAGTTCCTGTTGAACTAAGGCAATGGGAGCAGGGGCGGGTGC	<i>PYC1</i> , bp +3468 bis +3535, p3HAT-his5 5' der HA-Sequenz
HP28	AGGTAAATAAATAAGATTCGGGTAATTATACATTATAAATGAGAACTAACCCCTCGAGGTCGACGGTATCG	<i>PYC1</i> , bp +3592 bis +3543 (Terminator), p3HAT-his5 3' der his5-Kassette
HP31	ATTTGTTGGTTGTCCTAGAAGAAGAAACCCTACCCCATCCCAAAAAAGTTGGGAGCAGGGGCGGGTGC	<i>PYC2</i> , bp +3491 bis +3541, p9MycT-kanMX 5' der Myc-Sequenz
HP32	CGCCATATATAGTACAGCTAGTATTTCAGATGTCATAAAATATAATTAAACCCCTCGAGGTCGACGGTATCG	<i>PYC2</i> , bp +3603 bis +3554 (Terminator), p9MycT-kanMX 3' der kanMX-Kassette
HP35	TGCAGTAGTTTTCTGCATTATCAGCATCGTTGTTTTCCCTACATGCATCTGGGAGCAGGGGCGGGTGC	<i>BIO5</i> , bp +1635 bis +1684, p9MycT-kanMX 5' der Myc-Sequenz
HP36	TCTGACGATAGAGCTACAAAAGGTAGTATCGACCTAGGAATTTATAAGGACCCCTCGAGGTCGACGGTATCG	<i>BIO5</i> , bp +1758 bis +1709 (Terminator), p9MycT-kanMX 3' der kanMX-Kassette
HP38	ATATCCGCGGAGAGCCTTTATATATAGTTATGTTATAGCCG	<i>VHT1</i> , bp -70 bis -100, mit <i>SacII</i> -Schnittstelle
HP39	ATATCCGCGGACGAGCAATCGCCTTTTCA	<i>VHT1</i> , bp -63 bis -45, mit <i>SacII</i> -Schnittstelle
HP45	ATATATGTCGACGCGGTACGGCGCTTTC	<i>VHT1</i> , bp -226 bis -241, mit <i>SallI</i> -Schnittstelle
HP47	ATATCTCGAGAAATCATCATTAGTTCACCCGAAATGGCTC	<i>VHT1</i> , bp -305 bis -276, mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
HP48	TAGTTTAAACGCTAGCATAATCTCAGAGCCATTTCTGTCG	pMELβ2-Fragment D, bp +1 bis -23, 5' der BRE-Sequenz; mit <i>NheI</i> - und <i>PmeI</i> -Schnittstelle
HP49	ATAAAGAAGGGCCAACCTGTAGCCGTATTAAGCGCCATGAGAATGGAAATGATTATATCTTCTCCATCC	<i>pyc1 A3404G</i> , bp +3364 bis +3432

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
HP50	GTGAAAAGGGCGAATCGATTGCTG TTTTGAGTGCCATGAGAATGGAAATG GTTGTCTCTTCACC	<i>pyc2 A3407G</i> , bp +3367 bis +3431
JST25	AAAAAAGCTTGAGACTCTTTCACCC AACTGTG	<i>VHT1</i> , bp -221 bis -200, mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
JST26	AAAAAAGCTTCTGCATGACTCTTAC GGCTATAAC	<i>VHT1</i> , bp -115 bis -91, mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
JST27	TTTTTGCATGCTCTATTGATTTGTGT CGGTCC	<i>VHT1</i> , bp -3 bis -23, mit <i>SphI</i> -Schnittstelle
JST28	TTTTGCATGCAAGAGCAGAAAGCCC TAGTAAAGC	<i>HIS3</i> , bp +7 bis +28, mit <i>SphI</i> -Schnittstelle
JST29	GCTCTAGACGCCTCGTTCAGAATGA CACC	<i>HIS3</i> , bp +814 bis +794, mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle
JST71	TGGTACCAAACGATGTTCCCTCCACC	<i>HIS3</i> , bp +621 bis +645; Fehlpaarung
JST72	GGGCTTTCTGCTCTGTCATCTTTGCC	<i>HIS3</i> , bp +19 bis -7
JST83	GCGGATAACAATTTACACACAGG	pUC19, bp -47 bis -26, 5' der <i>HindIII</i> -Schnittstelle
JST84	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG	pUC19, bp +57 bis +38, 3' der <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
JST201	TATCTAGATTTGAGGTATGGTGTCT AAAGCG	<i>VHT1</i> , bp +1837 bis +1814, mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle
JST227	CTCTTACACTGTACCTCGTTCGC	<i>VHT1</i> , bp +2034 bis +2012
JST259	ATGTTTAAACCTCGAGACACAGAAA GCGCCGTACC	<i>VHT1</i> , bp -246 bis -228, mit <i>XhoI</i> -und <i>PmeI</i> -Schnittstelle

2.1.4 Puffer und Lösungen

ABTS-Lösung:	0,1 M 0,03 % (v/v) 0,5 mg/ml	Citrat-Puffer, pH 4,2 H ₂ O ₂ ABTS
Aufbruchspuffer:	2 % (w/v) 1 g (w/v) 100 mM 10 mM 1 mM	Triton X-100 SDS NaCl Tris/HCl, pH 8,0 EDTA
Acrylamid 30 %:	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)	Acrylamid Bisacrylamid
Bradfordlösung (5x):	0,05 % (w/v) 24 % (v/v) 50 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250 Ethanol H ₃ PO ₄ (85 %)
Citrat-Puffer:	0,1 M	Citronensäure/Na-Citrat, pH 4,2
Citrat-Phosphat-Puffer:	30,7 mM 38,6 mM	Citronensäure Na ₂ HPO ₄
Coomassie-Färbelösung:	0,05 % (w/v) 10 % (v/v) 25 % (v/v)	Coomassie Serva Blue R Essigsäure Isopropanol

Entfärbelösung:	10 % (v/v)	Essigsäure
KPO ₄ -Puffer (1 M):	1 M	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Ladepuffer für Agarosegele (10x):	100 mM 60 % (w/v) 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	EDTA Glycerin Bromphenolblau Xylen Cyanol
Overlay-Lösung (2x):	0,8 M 12 % (v/v) 2 % (v/v) 0,1 % (v/v) 1 mg/ml	KPO ₄ -Puffer, pH 7,0 DMF Triton X-100 β-Mercaptoethanol X-Gal (20 mg/ml in DMF)
PBS(T) (10x):	8 % (w/v) 0,2 % (w/v) 1,44 % (w/v) 0,24 % (w/v) (0,1 % (v/v)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ → pH 7,4 (mit NaOH bzw. HCl) Tween 20)
RNase A:	10 mg/ml 0,01 M	Ribonuclease A NaAc, pH 5,2 → 15 min 100 °C, bei RT abkühlen, pH-Wert mit 0,1 Volumen 1 M Tris/HCl, pH 7,4 einstellen, Lagerung -20 °C
Sammelgelpuffer:	0,139 M 0,11 % (w/v)	Tris/HCl, pH 6,8 SDS
SDS-Laufpuffer:	25 mM 192 mM 0,1 % (w/v)	Tris Glycin SDS
SDS-Probenpuffer (4x):	250 mM 8 % (w/v) 20 % (w/v) 20 % (w/v) 0,4 % (w/v)	Tris/HCl, pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
STET-Puffer:	8 % (w/v) 5 % (v/v) 50 mM 50 mM	Saccharose Triton X-100 EDTA Tris/HCl, pH 8,0
TB-Puffer:	10 mM 15 mM 250 mM 55 mM	Pipes CaCl ₂ KCl → mischen, pH 6,7 mit KOH MnCl ₂ → steril filtrieren
TBE-Puffer (5x):	445 mM 445 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 8,0 Borsäure EDTA
TE _{10/1} :	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA
TE _{25/5} :	25 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA

TE-RiboA:	100 µg/ml	RNase A in TE _{10/1}
Transfer-Puffer (2x):	0,48 % (w/v)	Tris
	2,24 % (w/v)	Glycin
	40 % (v/v)	Methanol
	0,04 % (w/v)	SDS
Trenngelpuffer (3x):	1,126 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,3 % (w/v)	SDS
Z-Puffer:	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄ → pH 7,0 (mit NaOH bzw. HCl)
	40 mM	β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

2.1.5 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und stammten, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt). Verbrauchsmaterial wurde vor allem von den Firmen Greiner (Kremsmünster, Österreich), Gilson (Bad Camberg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

Applichem (Darmstadt): IPTG, BSA (# A0846), ABTS

Amersham Bioscience (Braunschweig): D-(carbonyl)-¹⁴C Biotin, ECL-Detektionssysteme

Becton Dickinson (LePont de Claix, Frankreich): Bacto Pepton, Bacto Trypton, Hefeextrakt, YNB w/o AS, Bacto Casaminoacids, Bacto Agar (Difco)

BIO 101 (Heidelberg): YNB w/o AS und Vitamine

Biomol (Hamburg): d-Biotin

Biozym (Hess. Oldendorf): "low melting point" Agarose

Calbiochem (San Diego, USA): G418

Fluka (Buchs): myo-Inositol, Tryptophan (# 93659), Methionin

FujiFilm

Greiner (Kremsmünster, Österreich): ELISA-Platten (# 655081)

MBI-Fermentas (St Leon-Rot): dNTPs, Restriktionsenzyme und Puffer, T4-DNA Ligase und Puffer, 1 kb DNA Standard „Gene Ruler“

Millipore (Molsheim, Frankreich): „Steriflip“ (50 ml Vakuum-Sterilfilter), „Steritop“-Sterilfilter (500 ml Aufsatz auf Glasflaschen)

neoLab (Heidelberg): sterile Impfösen (1 µl und 10 µl)

New England Biolabs (Schwalbach): Restriktionsenzyme und -puffer, Phusion DNA-Polymerase, Vent DNA-Polymerase, Tag DNA-Polymerase, CIP, Proteinstandard „broad range“

Operon Biotechnologies GmbH (Köln): Oligonukleotide

Peqlab (Erlangen): Agarose

Perbio Science Deutschland gMBH (Bonn): SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat, Streptavidin Meerrettichperoxidase Konjugat

Quiagen (Hilden): QIAquick Gel Extraction Kit (50), QIAprep Spin Miniprep Kit (50), MinElute Gel Extraction Kit (50)

Roth (Karlsruhe): Acrylamidlösung, Agar-Agar, Ampicillin, Ethidiumbromid, Galaktose, Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm), Mikrotiterplatten Rotilabo 96U, PCR tubes 0,2 ml, 2 ml Cryoröhrchen, SDS, Spritzensterilfilter Rotilabo 0,22 µm, Szintillationscocktail Rotiszint eco plus, Aqua Roti-Phenol, Roti-Phenol, X-Gal, Tryptophan

Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, USA): anti-HA-Antikörper (sc-805), anti-Myc-Antikörper (sc-789)

Schleicher & Schuell (Dassel): Nitrocellulose Transfermembran „Protran“

Serva (Heidelberg): APS, Coomassie Serva Blue R

Sigma-Aldrich (Steinheim): Histidin, Leucin, Lysin, Lithiumacetat, PEG-3350, TritonX100, Adenin, Uracil, Folsäure, TEMED, RNase A, Heringssperma-DNA, Lysozym, EMS, 3-Aminotriazol, anti-rabbit Meerrettichperoxidase Konjugat, Biotinamidocapronat N-Hydroxy-Succinimidester, DMF, Coomassie Brilliant Blue G-250, ONPG, Tween 20, Diaminobiotin, Ammonium Eisen(II)sulfat-Hexahydrat, Dinatriumbathophenanthroline-disulfonat-Hydrat

Thermo Electron GmbH (Ulm): Oligonukleotide

USB (Bad Homburg): Tris

Die Antiseren gegen Bio2p und Por1p waren ein Geschenk von Ulrich Mühlenhoff und Roland Lill (Philipps-Universität Marburg, Deutschland). Biotinyl-AMP war ein Geschenk von Dorothy Beckett (University of Maryland, Baltimore County, USA). KAPA war ein Geschenk von Claude Alban (Université Joseph Fourier, Grenoble, Frankreich).

2.1.6 Geräte

Amersham	Photometer Ultrospec 3100 pro
Beckman	Szintillationszähler LS 6000SC, Ultrazentrifuge L8-70M
BIO101	Ribolyser Thermo Savant, Fast Prep™ FP 120
Biometra	T3 Thermocycler
Biorad	Gelelektrophorese-Apparaturen, Spannungsquelle PowerPac ^{HC}
Christ	SpeedVac RVC 2-18
Eppendorf	Zentrifuge Mini Spin plus, Zentrifuge 5417R, Thermomixer 5436
Epson	Scanner Epson Perfection 3200 Photo
Gilsen	Pipetten (10/ 20/ 200/ 1000 µl)
Hettich	Zentrifuge Rotina 35R
Heraeus Instruments	Wärmeschrank
Hoefer Scientific	Geltrockner SE 540
ICN Biomedicals	Sterilbank BSB 4A
Kaiser, Konrad Benda	UV Flächenstrahler, Videokamera RA2
Kern	Feinwaage 770
Memmer	Wärmeschränke
New Brunswick Scientific	Luftschüttler G25, Wasserbadschüttler
Protec	Entwicklermaschine Optimax 2010
Singer	System 300 Tetrad Dissection Mikroskop
Sorvall	Zentrifuge Evolution RC
Wolf	SANOclav Tischautoklav
WTW	Digitales pH-Meter

2.1.7 Internetdienste

Sequenzvergleich	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html
BLAST-Suchprogramm	http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/nph-blast2sgd
ExPASy / Swiss-Prot	http://kr.expasy.org/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed
SGD	http://www.yeastgenome.org/
Schmelzpunktberechnung	http://nature.berkeley.edu/~zimmer/oligoTMcalc.html

2.1.8 Software

DNA Strider 1.4f13	Bearbeitung von DNA-Sequenzen
ApE-Plasmideditor v1.09.1	Bearbeitung von DNA-Sequenzen
FileMaker Pro 2.1	Datenbankprogramm, Verwaltung von Dauerkulturen und Oligonukleotiden
ISIS Draw 2.3	Darstellung von Strukturformeln
Microsoft Word / Excel	Textverarbeitung / Diagramme und Tabellen
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator 10	Grafikdesign

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Medien

- Medien zur Kultivierung von *E. coli*

2TY, 2TY _{Amp} :	1,6 % (w/v)	Trypton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	1,5 % (w/v)	Agar (für Platten)
	100 mg/l	Ampicillin (zur Selektion)
50x SOC:	1 M	Glukose
	500 mM	MgCl ₂
	500 mM	MgSO ₄
SOB:	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	nach dem Autoklavieren Zugabe von 50x SOC auf 1x SOC	

- Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

YPD, YPD _{G418} :	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Bacto Pepton
	2 % (w/v)	Glukose
	2 % (w/v)	Agar (für Platten)
	100 mg/l	G418 (zur Selektion)

Synthetisches Minimalmedium (Selektionsmedium) MMA / MMGal:

0,67 % (w/v)	YNB w/o AS
2 % (w/v)	Glukose bzw. Galaktose
2 % (w/v)	Agar (für Platten)
nach dem Autoklavieren Zusatz von Aminosäuren und Nukleobasen nach Bedarf	

Synthetisches Minimalmedium mit variablem Vitaminzusatz (synthetisches Vitaminmedium)
MMA-Vit / MMGal-Vit:

10 % (v/v)	10x YNB w/o N-Quelle, AS und Vitamine
0,5 % (w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄
2 % (w/v)	Glukose bzw. Galaktose
2 % (w/v)	Difco Bacto Agar (für Platten)

nach dem Autoklavieren Zusatz von Vitaminen (ohne Biotin),
nach Bedarf Zusatz von Aminosäuren und Nukleobasen,
Zusatz von Biotin, DTB oder KAPA wie angegeben
(statt der 10x Stammlösung und dem (NH₄)₂SO₄ wurde auch
0,67 % (w/v) YNB w/o AS und Vitamine verwendet (Bio 101, Inc.))

10x YNB ohne N-Quelle, AS und Vitamine [Wickerham, 1946; Wickerham und Burton, 1948]:

5 mg/l	Borsäure (H ₃ BO ₃)
0,4 mg/l	Kupfersulfat (CuSO ₄ · 5 H ₂ O)
1 mg/l	Kaliumjodid (KI)
2 mg/l	Eisenchlorid (FeCl ₃ · 6 H ₂ O)
4 mg/l	Mangansulfat (MnSO ₄ · 4 H ₂ O)
2 mg/l	Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O)
4 mg/l	Zinksulfat (ZnSO ₄ · 7 H ₂ O)
10 g/l	Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)
5 g/l	Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)
1 g/l	Natriumchlorid (NaCl)
1 g/l	Calciumchlorid (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)

GNA-Platten (Präsporulationsplatten):

5 % (w/v)	Glukose
3 % (w/v)	Nutrient broth
1 % (w/v)	Hefeextrakt
2 % (w/v)	Agar

Sporulationsmedium: 1 % (w/v) Kaliumacetat
0,005 % (w/v) Zinkacetat

- Zusätze

Aminosäuren und Nukleobasen:

Bei den synthetischen Minimalmedien wurden die benötigten Aminosäuren und Nukleobasen nach dem Autoklavieren zugegeben. Dazu wurden 100x Stammlösungen hergestellt und autoklaviert. Die Tryptophan-Stammlösung wurde sterilfiltriert und im Dunkeln aufbewahrt. Die Endkonzentrationen betrugen bei Adenin, Uracil, Histidin, Methionin und Tryptophan je 20 mg/l und bei Leucin und Lysin je 30 mg/l.

Als Zusatz für die synthetischen Vitaminmedien wurden extra reines Tryptophan und extra reines Methionin verwendet.

Vitamine:

Zum synthetischen Vitaminmedium wurden bis auf Biotin alle Vitamine in der Standardkonzentration von YNB [Wickerham, 1946; Wickerham und Burton, 1948] zugesetzt. Dazu gehören Calcium-Panthothenat (400 µg/l), Folsäure (2 µg/l), Inositol (2 mg/l), Niacin

(400 µg/l), p-Aminobenzoessäure (200 µg/l), Pyridoxin/HCl (400 µg/l), Riboflavin (200 µg/l) und Thiamin/HCl (400 µg/l).

Die Zugabe von Biotin, DTB bzw. KAPA erfolgte wie jeweils angegeben. Die Standardkonzentration von Biotin ist 2 µg/l bzw. 10 nM.

Casaminosäuren:

Zur Selektion von Klonen auf MMA(-Ura)-, MMA(-Trp)- bzw. MMA(-Ade)-Platten wurden dem MMA-Medium 0,1 % (w/v) Casaminosäuren und entsprechend Uracil, Adenin oder Tryptophan zugefügt. Für die Anzucht unter definierten Testbedingungen wurden Casaminosäuren nicht eingesetzt.

3-Amino-1,2,4-Triazol (+AT):

Zur kompetitiven Inhibition von His3p [Klopotoski und Wiater, 1965; Struhl und Davis, 1977; Horecka und Sprague, 2000] wurden Hefen in Medium mit 3-Amino-1,2,4-Triazol (Endkonzentration jeweils angegeben) angezogen. Dazu wurde eine 1 M AT-Lösung sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Fettsäuren (+FS):

Bei Mutanten, bei denen die Fettsäurebiosynthese gestört war, wurde dem Medium nach Mishina *et al.* [1980] 300 mg/l Butterhydrolysat (in einer KOH/Methanol-Lösung unter Rückfluss gekochte Butter) und 1 % (v/v) Tween 40 zugesetzt.

Aspartat (+Asp):

Das Minimalmedium zur Anzucht der Pyc-Mutanten enthielt zusätzlich 40 mM L-Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 5.0 eingestellt.

Inositol / Cholin (+IC):

Zum Test einer IC-abhängigen *VHT1*-Expression wurde Minimalmedium 50 µM Inositol und 1 mM Cholin zugesetzt.

Eisen (+Fe²⁺)/ Bathophenanthrolindisulfonat (+BPS):

Minimalmedium zur Anzucht von Zellen bei hohen Eisenkonzentrationen enthielt zusätzlich 300 µM Ammoniumeisen(II)sulfat (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O). Zur Anzucht von Hefe bei Eisenmangel wurde Minimalmedium 100 µM Bathophenanthrolindisulfonat (ein Fe(II)-Chelator) zugesetzt.

2.2.1.2 Anzuchtbedingungen

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte in 2TY- bzw. 2TY_{Amp}-Flüssigmedium im Luftschüttler oder über Nacht auf Platte in temperaturkonstanten Inkubatoren bei 37 °C.

Die Hefestämme wurden im jeweiligen Medium bei 30 °C als Flüssigkultur im Luftschüttler oder über mehrere Tage auf Platte im Inkubator angezogen. Die Ernte der Zellen aus Flüssigkultur erfolgte in der Eppendorf Tischzentrifuge (14500 rpm, 30 sec) oder in der Hettich Zentrifuge (Rotina 35R, 4000 rpm, 3 min).

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch über die optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Bei Hefen entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 10⁷ Zellen/ml. Die Bezeichnung 1 OD₆₀₀ Zellen bezieht sich auf die Menge Zellen, die in 1 ml einer Kultur mit einer OD₆₀₀ = 1 enthalten sind.

2.2.1.3 Dauerkulturen

Für das Anlegen von Dauerkulturen wurden auf Platte frisch angezogene Zellen in YPD mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.4 Wachstumstest

Zur Beurteilung des Wachstums von Hefezellen auf unterschiedlichen Medien wurden frisch angezogene Zellen auf 96-Loch-Mikrotiterplatten in Wasser resuspendiert. Beginnend mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6 wurden 10-fach Verdünnungen hergestellt und diese mit einem 48-zähligen Metallstempel (6x8 Zähne) auf Platten übertragen [Stolz und Vielreicher, 2003]. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Stämme durch Scannen der Platten dokumentiert. Wurde eine große Menge an Stämmen gleichzeitig untersucht, wurde oftmals auf eine Einstellung der OD₆₀₀ verzichtet und weniger Verdünnungen hergestellt (z.B. bei der Analyse von Sporen oder EMS-Mutanten). Zum Teil wurden die Platten nachfolgend für Overlay-Tests eingesetzt (Kapitel 2.2.3.5).

Um Hefezellen über einen breiten Konzentrationsbereich von Histidin oder Biotin und KAPA zu testen, wurden frisch angezogene Hefezellen in Wasser resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 0,05 (Histidinplatten) bzw. OD₆₀₀ = 0,01 (Biotin- und KAPA-Platten) verdünnt. Jeweils 150 µl dieser Verdünnung wurden mit Glasperlen gleichmäßig auf Minimalmedium-Platten ohne Histidin bzw. ohne Biotin plattiert (≈ 75000 Zellen). In die Mitte der Platten wurde jeweils ein Filterplättchen (Whatmann, Ø 9 mm) platziert, auf welches 20 µl 2 g/l Histidin (= 100x Standardkonzentration) oder 20 µl 2 µg/l Biotin bzw. KAPA (= jeweils 1000x Standardkonzentration) ausgebracht wurde. Während der Inkubation der Platten bei 30 °C verteilten sich die Substanzen auf den Platten diffusionskontrolliert. Dieser Test wurde mit dem Overlay-Test (Kapitel 2.2.3.5) kombiniert.

2.2.1.5 Kreuzen von Hefestämmen

Die haploiden Stämme wurden in Wasser resuspendiert, auf YPD-Platten vermischt und über Nacht inkubiert. Durch Ausbringen der so gekreuzten Stämme auf Selektionsplatten (Selektion auf die Marker beider Haploiden) konnten die diploiden Klone isoliert werden.

2.2.1.6 Tetradenanalyse

Diploide Hefestämme wurden frisch auf YPD angezogen und dann etwa 5 Tage in Sporulationsmedium bei 25 °C geschüttelt. Hatten sich Tetraden gebildet, wurden 50 µl Kultur geerntet und die Zellen in 50 µl Zymolyase-Lösung (2,5 mg/ml Zymolyase 20000T in 1 M Sorbitol) resuspendiert und etwa 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach vorsichtiger Zugabe von 800 µl

eiskalten Wassers wurden die Zellen auf Eis gehalten und der Verdau der Asci unter dem Mikroskop überprüft. Die Sporen wurden dann auf einer YPD-Platte mit einem Mikromanipulator vereinzelt und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Analyse des Phänotyps der erhaltenen Sporen erfolgte mit einem Wachstumstest (Kapitel 2.2.1.4).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der SEM-Methode von Inoue *et al.* [1990] erzeugt. Die Anzucht der Zellen über Nacht erfolgte bei DH5 α in 2TY-Medium; bei XL1-blue wurde dem 2TY-Medium noch 12,5 mg/l Tetracyclin (Stammlösung: 12,5 mg/ml in 50 % EtOH) zugesetzt. Aliquots der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde wie in Sambrook *et al.* [1989] beschrieben durchgeführt.

2.2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde nach Gietz *et al.* [1995] bzw. Gietz und Woods [2002] durchgeführt.

- Hefetransformation mit sehr hoher Effizienz

50 ml YPD wurden aus einer ÜN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,5 überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 2 bis 4 angezogen. Nach der Ernte (Rotina 35R, 4000 rpm, 3 min) wurden die Zellen mit Wasser gewaschen, in 1 ml 100mM LiAc resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 400 μ l 100 mM LiAc aufgenommen, die Zellen in 50 μ l Portionen auf Reaktionsgefäße verteilt und erneut pelletiert. Zum Pellet wurden 240 μ l 50 % (w/v) PEG, 36 μ l 1 M LiAc, 50 μ l carrier-DNA (2 mg/ml in TE_{10/1}-Puffer, frisch aufgeköcht), 34-x μ l H₂O und x μ l DNA (von ~ 2 μ l Vektor bis 20 μ l PCR-Produkt) gegeben. Nach kräftigem Vortexen wurden die Ansätze 30-60 min bei 30 °C und 20 min bei 42 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und pelletiert (Tischzentrifuge, 6000 rpm, 2 min). Die Zellen wurden in 200 μ l H₂O aufgenommen und auf entsprechenden Selektionsplatten ausgebracht.

Falls eine Selektion auf G418-Resistenz stattfand, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren für etwa 2 bis 4 h in 1 ml YPD bei 30 °C inkubiert.

Die Transformation mit sehr hoher Effizienz wurde als Standardmethode für die Transformation von Vektoren, Ligationsansätzen, PCR-Produkten und Genbanken eingesetzt.

- Schnelltransformation

Für eine Schnelltransformation wurde obiges Protokoll verkürzt. Dazu wurden auf Platte frisch angezogene Hefen in 1 ml H₂O resuspendiert, kurz pelletiert und in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen. Nach einer Inkubation von 5 min bei 30 °C wurden die Zellen auf Reaktionsgefäße

verteilt und wie oben beschrieben mit PEG, LiAC, carrier-DNA und DNA überschichtet und resuspendiert. Danach erfolgten nur der Hitzeschritt und das Ausbringen der Zellen auf Platte.

2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kit der Firma Qiagen oder nach der STET-Methode von Holmes und Quigley [1981]. Bei letzterer wurden etwa 1,5 ml ÜN-Kultur geerntet und das Pellet in 500 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 10 mg/ml Lysozym (in STET-Puffer) wurde die Suspension 2 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 14500 rpm) und das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 5 min, 14500 rpm). Nach dem Waschen des Pellets mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 100 µl TE-RiboA gründlich resuspendiert. Die Lösung wurde 3 min bei 65 °C inkubiert und 3 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 14500 rpm). Die im Überstand enthaltene DNA konnte direkt für Restriktionsanalysen oder Klonierungen eingesetzt werden.

Vor einer Sequenzierung mussten Plasmide aus STET-Minipräparationen gereinigt werden. Dies erfolgte nach der „QIAquick Plasmid Purification“-Methode aus dem QIAprep Spin Miniprep-Kit der Firma Qiagen.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* (Plasmid-Rescue)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bäckerhefe wurde das Protokoll von Robzyk und Kassir [1992] angewandt. Dazu wurden Hefen über Nacht unter Selektivbedingungen bis zur Sättigung angezogen und 1,5 ml der Kultur geerntet. Die Zellen wurden in 100 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von etwa 0,2 g Glasperlen (Ø 0,5 mm) im Ribolyser 45 sec auf Stufe 5 aufgeschlossen. Nach dem Zufügen weiterer 100 µl STET-Puffer wurde die Suspension kurz gemischt, 3 min bei 95 °C gekocht, auf Eis abgekühlt und 10 min bei 4 °C zentrifugiert. In ein neues Reaktionsgefäß mit 50 µl 7,5 M NH₄Ac wurden 100 µl des Überstandes überführt, 1 h bis über Nacht bei -20 °C gefällt und 10 min bei 4 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden zu 200 µl eiskaltem EtOH gegeben, die DNA pelletiert und mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. 5 bis 10 µl der Plasmid-Lösung wurden schließlich in die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.2.2.6 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen wurde nach Hoffman und Winston [1987] durchgeführt. 5 – 10 ml einer stationären ÜN-Kultur wurden geerntet und das Pellet in 200 µl Aufbruchpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und ~ 0,3 g Glasperlen (Ø 0,5 mm) wurden die Zellen im Ribolyser (30 sec, Stufe 5) aufgebrochen. Anschließend wurden 200 µl TE_{10/1}-Puffer zugegeben und 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. 200 µl des wässrigen Überstandes wurden zu 1 ml EtOH in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, durch Invertieren gemischt und 2 min zentrifugiert. Das feuchte Pellet wurde in 400 µl TE_{10/1}-Puffer mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert und 5 min bei 65 °C geschüttelt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml EtOH mit 40 mM NH₄Ac und 2 min Zentrifugation gefällt. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl TE_{10/1}-Puffer aufgenommen.

2.2.2.7 Phenolextraktion von DNA

Proteinverunreinigungen in DNA-Präparationen wurden durch Phenolextraktion entfernt. Dazu wurde ein Volumenteil DNA mit einem Volumenteil TE-gesättigtem Phenol (Roti-Phenol), pH 8,0, versetzt und 1 min geschüttelt. Nach 1 min Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 14500 rpm) wurde die wässrige obere Phase abgenommen, das darin partiell gelöste Phenol mit einem Volumenteil Diethylether extrahiert und das Gemisch erneut zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der Ether- und der Interphase wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,2, und einem Volumenteil kaltem EtOH und 20-minütiger Inkubation bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 5 min, 4 °C, 14500 rpm), mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, getrocknet und in TE_{10/1}-Puffer aufgenommen.

2.2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA wurde die Absorption bei 260 nm im Photometer gemessen. Außerdem wurde folgende Beziehung angenommen:

$1 A_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml}$ Doppelstrang-DNA

Der Quotient A_{260}/A_{280} und das Absorptionsspektrum (200 nm – 320 nm) waren ein Maß für die Reinheit der DNA-Präparation.

2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese und DNA-Elution

Die DNA wurde in 0,8 % - 1,2 % igen Agarosegelen (Universal Agarose in TBE) aufgetrennt. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA aus präparativen Gelen ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit oder dem MinElute Gel Extraction Kit von Qiagen aus dem Gel eluiert.

2.2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurden die Taq DNA-Polymerase (NEB bzw. Isolation von Roland Donhauser), die Vent DNA-Polymerase oder die Phusion™ „High-Fidelity“ DNA-Polymerase eingesetzt. Gewöhnlich wurden 25 – 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden den Primern, dem PCR-Produkt und den eingesetzten Polymerasen angepasst. Dabei wurde bei der Taq eine Reaktionsgeschwindigkeit von ~ 1000 bp/min, bei der Vent von ~ 670 bp/min und bei der Phusion von ~ 3000 bp/min angenommen. Die Amplifikation erfolgte mit dem T3 Thermocycler von Biometra. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert bzw. gereinigt.

2.2.2.11 Klonierungstechniken

Die Standardmethoden zur Manipulation von DNA (Restriktionsverdau von Plasmiden oder DNA-Fragmenten, Dephosphorylierung, Ligation) und die Herstellung analytischer und präparativer Agarosegele erfolgten nach Sambrook *et al.* [1989].

2.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB (Göttingen) bzw. der Firma Entelechon (Regensburg) durchgeführt.

2.2.2.13 EMS-Mutagenese

In einem Vorversuch wurde ermittelt, wie lange das Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS, Sigma, M0880) auf die Hefezellen (W303-1A VPA-*HIS3*) einwirken muss, damit man eine Überlebensrate von etwa 10 % erhält. Außerdem wurde die Konzentration der lebenden Zellen im Mutationsansatz bestimmt.

Dazu wurden aus einer in YPD gewachsenen ÜN-Kultur etwa 2×10^8 Zellen ($\cong 20$ OD₆₀₀ Zellen) geerntet und in 1,5 ml YPD resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, 1x mit 0,01 M KPO₄-Puffer, pH 7, gewaschen und schließlich in 1,5 ml Puffer aufgenommen. Nach 5 sec im Ultraschallbad wurden die Zellen zu 250 µl Aliquots (6x) in Reaktionsgefäße verteilt. Zu den Ansätzen 2-5 (# 2-5) wurden je 5 µl EMS pipettiert. Die Ansätze wurden unter Schütteln bei 30 °C (Thermomixer, 500 rpm) unter dem Abzug inkubiert. Nach 0 min (#1, Nullwert), 30 min (#2), 60 min (#3), 90 min (#4), und 120 min (#5+#6) wurde die Reaktion mit je 1 ml 5 % (w/v) Natriumthiosulfat gestoppt, die Zellen pelletiert, 2x mit Wasser und 1x mit Minimalmedium gewaschen und schließlich in 1 ml Medium resuspendiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden verschiedene Verdünnungen auf Minimalmedium ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C angezogen. Die Auswertung der Koloniezahlen ergab eine günstige Mutationszeit von 100 min.

Der Hauptversuch wurde wie der Vorversuch durchgeführt. Diesmal wurden jedoch die Ansätze 2-6 mit EMS versetzt und 100 min mutagenisiert. Außerdem wurden die Ansätze nach dem letzten Waschschrift vereinigt und dann so mit MMA-His/-Leu verdünnt, dass etwa 1000 Kolonien pro Platte (MMA-His/-Leu/+ 20 mM AT) ausgebracht wurden. Zur Kontrolle des Nullwertes und der Überlebenszahl wurden verschiedene Verdünnungen auf MMA-Leu ausplattiert.

2.2.2.14 Herstellung verschiedener Stämme

- *PYCI*-3HA

C-terminale Markierung von *PYCI* mit einem 3-fachen HA-Epitop: Mit den Oligonukleotiden HP27 und HP28 wurde die 3HA-Sequenz in Verbindung mit einer *his5*⁺-Kassette [Wach *et al.*, 1997] über PCR aus dem Plasmid p3HAT-*his5* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm W303-1A transformiert und über die endständigen ORF- und Terminator-Sequenzen von *PYCI* durch homologe Rekombination ins Genom integriert. Eine Bestätigung der C-terminalen 3HA-Markierung von *PYCI* erfolgte über Western Blot-Analyse.

- *PYC2*-9Myc

C-terminale Markierung von *PYC2* mit einem 9-fachen Myc-Epitop: Mit den Oligonukleotiden HP31 und HP32 wurde die 9Myc-Sequenz in Verbindung mit einer *kanMX4*-Kassette [Wach *et al.*, 1994] über PCR aus dem Plasmid p9MycT-*kanMX* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm W303-1A transformiert und über die endständigen ORF- und Terminator-Sequenzen von *PYC2* durch homologe Rekombination ins Genom integriert. Eine Bestätigung der C-terminalen 9Myc-Markierung von *PYC2* erfolgte über Western Blot-Analyse.

- *pyc1 pyc2Δ*

Austausch von *pyc2* gegen *pyc2Δ* im *pyc1 pyc2*-Stammhintergrund: Mit den Oligonukleotiden HP23 und HP24 und der genomischen DNA von BY4742 *pyc2Δ::kanMX4* als DNA-Vorlage wurde die *pyc2Δ::kanMX4*-Deletionskassette über PCR amplifiziert und in den Stamm *pyc1 pyc2* transformiert. Der Austausch von *pyc2::URA3* gegen *pyc2Δ::kanMX4* wurde durch Überprüfung des Klonen auf G418-Resistenz und Uracilauxotrophie bestätigt.

- *pyc1 pyc2Δ vht1Δ*

Deletion von *VHT1* im *pyc1 pyc2Δ*-Stammhintergrund: Mit den Oligonukleotiden JST26 und JST201 und der genomischen DNA von *vht1Δ* als DNA-Vorlage wurde die *vht1Δ::HIS3*-Deletionskassette über PCR amplifiziert und in den Stamm *pyc1 pyc2Δ* transformiert. Die Deletion von *VHT1* wurde sowohl über den Wachstumsphänotyp von *pyc1 pyc2Δ vht1Δ* (der Stamm kann auf Minimalmedium ohne Zugabe von extra Biotin nicht mehr wachsen) als auch über PCR-Analyse der genomischen DNA mit Hilfe der Oligonukleotidpaare JST25/JST72 und JST71/JST227 überprüft.

- *pyc1 PYC2-9Myc*

C-terminale Markierung von *PYC2* mit einem 9-fachen Myc-Epitop im *pyc1*-Stammhintergrund: Die Klonierung von *pyc1 PYC2-9Myc* erfolgte analog der Klonierung des Stammes *PYC2-9Myc* (vgl. oben). Das PCR-Produkt wurde diesmal in den Stamm *pyc1* transformiert.

- *pyc1 pyc2^{K/R}-9Myc*

***PYC2*-Mutagenese (A3407G) und gleichzeitige C-terminale Markierung von *PYC2* mit einem 9-fachen Myc-Epitop im *pyc1*-Stammhintergrund:** Die Mutation und Markierung von *PYC2* im *pyc1*-Stamm wurde durch PCR-vermittelte homologe Rekombination erreicht. In der PCR wurden mit den Oligonukleotiden HP32 und HP50 und der genomischen DNA von *PYC2-9Myc* als DNA-Vorlage der C-Terminus von *PYC2* mit 9Myc-Epitop und die *kanMX4*-Markerkassette amplifiziert. Dabei wurde das Basentriplett des biotintragenden Lysins (AAA) aus *PYC2* in ein Arginincodon (AGA) umgewandelt. Über Western Blot-Analyse erfolgte die Prüfung der Mutation (Biotinbanden der Pyc-Proteine fehlen) und die der C-terminalen 9Myc-Markierung von *pyc2*. Die *pyc2*-Mutation wurde zudem über den Wachstumsphänotyp (*pyc1 pyc2^{K/R}-9Myc* wächst nur unter Zugabe von extra Aspartat) bestätigt.

- *pyc2 PYC1-3HA*

C-terminale Markierung von *PYC1* mit einem 3-fachen HA-Epitop im *pyc2*-Stammhintergrund: Die Klonierung von *pyc2 PYC1-3HA* erfolgte analog der Klonierung des Stammes *PYC1-3HA* (vgl. Seite 39). Das PCR-Produkt wurde diesmal in den Stamm *pyc2* transformiert.

- *pyc2 pyc1^{K/R}-3HA*

***PYC1*-Mutagenese (A3404G) und C-terminale Markierung von *PYC1* mit einem 3-fachen HA-Epitop im *pyc2*-Stammhintergrund:** Die Klonierung von *pyc2 pyc1^{K/R}-3HA* erfolgte analog der Klonierung des Stammes *pyc1 pyc2^{K/R}-9Myc* mit den Oligonukleotiden HP49 und HP28 und der genomischen DNA von *PYC1-3HA* als DNA-Vorlage.

- W303-1A VPA-*HIS3* (W303-1A *leu2::YIpMELβ2*-Fragment A-*HIS3-LEU2*)

Integration von *YIpMELβ2*-Fragment A-*HIS3-LEU2* in das *leu2*-Gen von W303-1A: Das Plasmid *YIpMELβ2*-Fragment A-*HIS3-LEU2* wurde zur Integration ins *leu2*-Gen von W303-1A

im *LEU2*-Markergen mit *EcoRV* geschnitten und in W303-1A transformiert. Der so erzeugte Stamm W303-1A *leu2::YIpMELβ2*- Fragment A -*HIS3-LEU2* wurde W303-1A VPA-*HIS3* (VPA für *VHT1*- Promotorfragment A) genannt.

- *tis11Δ*

Deletion von *TIS11* im W303-1A-Stammhintergrund:

Mit den Oligonukleotiden HP17 und HP18 und der genomischen DNA von BY4742 *tis11Δ* als DNA-Vorlage wurde die *tis11Δ::kanMX*-Deletionskassette über PCR amplifiziert und in den Stamm W303-1A transformiert. Die Deletion von *TIS11* wurde über PCR-Analyse der genomischen DNA mit Hilfe des Oligonukleotidpaares HP19/HP20 überprüft.

2.2.2.15 Klonierung verschiedener Plasmide

- YIpMELβ2-Fragment A-*HIS3-LEU2*

Plasmid zur Klonierung von W303-1A VPA-*HIS3*: In einem ersten Schritt wurde die *MEL1-lacZ*-Sequenz in YIpMELβ2 gegen die *MEL1*-Fragment A-Sequenz aus pMELβ2-Fragment A und *HIS3* aus *VHT1-HIS3* ausgetauscht. Dazu wurde die Promotorsequenz mit den Oligonukleotiden HP15 und HP16 und dem Vektor pMELβ2-Fragment A als DNA-Vorlage mittels PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SphI* verdaut. Außerdem wurde der Vektor *VHT1-HIS3* mit *SphI* und *SacI* verdaut, das 837 bp Fragment isoliert und zusammen mit dem PCR-Produkt in den *HindIII/SacI* geschnittenen Vektor YIpMELβ2 ligiert. Das so entstandene Plasmid wurde YIpMELβ2-Fragment A-*HIS3* genannt. In dem zweiten Schritt wurde der *URA3*-Marker gegen einen *LEU2*-Marker gewechselt. Dazu wurde pUC19-*LEU2* (O II) mit *SacI* und *HpaI* verdaut, das 2005 bp *LEU2*-Fragment isoliert und in den *SacI/EcoRV* geschnittenen Vektor YIpMELβ2-Fragment A-*HIS3* ligiert.

- YCplac33-*VHT1*

CEN-Plasmid mit *VHT1*-Sequenz: Die Plasmide YEp352-*VHT1* und YCplac33 wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* präparativ verdaut. Von dem Restriktionsansatz YEp352-*VHT1* wurde das 2997 bp-Fragment isoliert und in den aufgeschnittenen Vektor YCplac33 ligiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Gesamtproteinextraktion

Für die Gesamtproteinextraktion wurden alle Schritte auf Eis und mit gekühlten Lösungen und Zentrifugen durchgeführt. 5 OD Zellen wurden aus einer Flüssigkultur geerntet, mit 1 ml TE_{25/5}-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut pelletiert und der Überstand entfernt. Nach Zugabe eines kleinen Löffels Glasperlen (Ø 0,5 mm), 100 µl 1x SDS-Probenpuffers und 1 µl 1 M PMSF (in DMSO) wurden die Zellen im Ribolyser (30 sec, Stufe 5) aufgeschlossen. Nach erneuter Zugabe von 1 µl 1 M PMSF wurde der Ansatz 2 min bei 95 °C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (1 min, 14500 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je nach Anwendung wurden etwa 2 – 10 µl auf ein SDS-Gel geladen. Dies entspricht einer Proteinmenge aus ~ 0,1 – 0,5 OD Zellen.

Sollten Membranproteine wie Vht1p oder Bio5p anschließend im Western-Blot detektiert werden, wurde die Denaturierungstemperatur von 95 °C auf 42 °C reduziert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über 8 – 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele [Laemmli, 1970]. Dabei wurden 5 – 10 µl bzw. 10 µl (1:5 verdünnt) Gesamtproteinextrakt pro Spur geladen. Die Elektrophorese wurde zum Einlaufen der Proben bei 120 V und danach bis zum Auslaufen des Blaumarkers bei 200 V in einer BioRad Mini-Protean-Apparatur durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der „Protein Marker Broad Range“ von New England Biolabs verwendet.

Die Färbung der Proteinbanden im SDS-Gel erfolgte mit Coomassie-Färbelösung [Sambrook *et al.*, 1989]. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Entfärbelösung wieder entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf dem Gelrockner unter Vakuum getrocknet.

2.2.3.3 Western Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE im Wet-Blot-Verfahren 25 min bei 360 mA elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen überführt. Als Ladungskontrolle und zum Markieren der Standardbanden wurden die Proteinbanden auf der Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt. Zur Absättigung der Membran wurde diese 1 h in PBST-Puffer mit 1 % (w/v) Milchpulver geschwenkt. Anschließend wurde der primäre Antikörper (vgl. Tab. 2-1) in PBST-Milchpulver verdünnt und die Membran damit ÜN bei 4 °C überschichtet. Nach 3x 10 min Waschen in PBST-Milchpulver erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper (anti-rabbit Peroxidase Konjugat, Verdünnung 1:5000) in PBST-Milchpulver für mindestens 1 h. Die Detektion des gebundenen Peroxidase-Konjugats erfolgte nach weiteren 3x 10 min Waschen in PBST-Milchpulver und 1x 5 min in PBS mit Hilfe des ECL-Detektionssystems durch Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm.

Zur Detektion von biotintragenden Proteinen wurde Streptavidin Peroxidase Konjugat (Strep-PO; Pierce # 21126) eingesetzt.

Antikörper	Bezugsquelle / Referenz
anti-HA (sc-805)	Santa Cruz Biotechnology
anti-9Myc (sc-789)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Bio2p	U. Mühlenhoff und R. Lill; Marburg
anti-Por1p	U. Mühlenhoff und R. Lill; Marburg
anti-Vht1p	[Pirner und Stolz, 2006]

Tab. 2-1: Liste der verwendeten primären Antikörper

2.2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden mit der Methode nach Bradford [1976] durchgeführt. Dazu wurde 1 ml 1x Bradfordlösung in einem Reaktionsgefäß mit 10 µl Proteinextrakt vermischt (Referenz 10 µl H₂O). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min bei RT wurde die Absorption der Probe bei 595 nm bestimmt. Zur Erstellung einer Referenzgeraden wurden BSA-Lösungen ($A_{280} = 0,67$ entspricht 1 mg/ml BSA) von 0,2 mg/ml bis 1 mg/ml eingesetzt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.3.5 β -Galaktosidase-Aktivitätstest

Um die Promotoraktivität verschiedener *S. cerevisiae* Gene unter diversen Wachstumsbedingungen bzw. in verschiedenen Stämmen zu bestimmen, wurden β -Galaktosidasetests durchgeführt. Dazu wurden die Promotorsequenzen mit dem *lacZ*-Gen aus *E. coli* in *CEN*-Hefektoren fusioniert und die Konstrukte in die Hefestämme transformiert.

Bei den meisten Reportertests wurde *VHT1-lacZ* verwendet. Weitere Reporterplasmide waren beispielsweise *BIO2-lacZ* oder pMEL β 2 mit verschiedenen *VHT1*-Promotorfragmenten. pMEL β 2 ist ein *CEN*-Hefektor, der den UAS-freien *MEL1*-Promotor mit *lacZ* fusioniert enthält.

Die β -Galaktosidaseaktivität in den Zellen ist ein direktes Maß für die *lacZ*-Expression und damit für die Aktivität des untersuchten Promotors.

- β -Galaktosidase-Aktivitätstest mit Hefe-Rohextrakt

Zur quantitativen Bestimmung der Promotoraktivität wurde die β -Galaktosidaseaktivität in einem Flüssigtest mit Hefe-Rohextrakt gemessen. Der Test wurde in Anlehnung an Kaiser *et al.* [1994] durchgeführt [Pirner und Stolz, 2006].

Zunächst wurde ein Hefe-Rohextrakt hergestellt. Bei Standardtests wurden dazu die Zellen ÜN in MMA-Vit mit 2 μ g/l Biotin angezogen. Die Zellen wurden geerntet, mit Wasser gewaschen und eingesetzt, um drei Kulturen mit MMA-Vit mit 2 μ g/l Biotin und drei Kulturen mit 0,02 μ g/l Biotin auf eine OD₆₀₀ von 0,2 anzuimpfen. Nach 6 h befanden sich die Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~ 0,8 bis 1,2) und etwa 10 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet, mit kaltem KPO₄-Puffer gewaschen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden dann mit Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) in 250 μ l kaltem KPO₄-Puffer mit 1 μ l 1 M PMSF (in DMSO) im Ribolyser (30 sec, Stufe 5) aufgebrochen. Nach Zugabe von weiteren 250 μ l KPO₄-Puffer wurde das Lysat gemischt und 5 min zentrifugiert (4 °C, 13500 rpm). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß mit 1 μ l 1 M PMSF überführt, erneut 1 min zentrifugiert und auf Eis aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration des Rohextraktes wurde, wie auf Seite 42 beschrieben, nach Bradford bestimmt. Parallel dazu wurde die β -Galaktosidaseaktivität im Rohextrakt durch die Umsetzung von ONPG zu ONP gemessen. 800 μ l Z-Puffer, 200 μ l ONPG (4 mg/ml in Z-Puffer) und 100-x μ l KPO₄-Puffer wurden in einem Reaktionsgefäß vermengt und 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch die Zugabe von x μ l Rohextrakt wurde die Farbreaktion gestartet. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte jeweils so lange bis eine leichte Gelbfärbung einsetzte. Dann wurde die Reaktion mit 400 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt, der Ansatz zentrifugiert (1 min, 14500 rpm) und die Absorption des Überstandes bei 420 nm im Photometer bestimmt. Eine Einheit β -Galaktosidaseaktivität (U) entspricht der Hydrolyse von 1 μ mol ONPG pro min und mg Protein bei 37 °C. Bei der Berechnung der Aktivität wurde unter Beachtung des Reaktionsvolumens von 1,5 ml und des Extinktionskoeffizienten von ONP $\epsilon_{420} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ folgende Formel verwendet:

$$1 U = \frac{A_{420}}{3 \cdot c_{\text{Prot}} \cdot V_{\text{RE}} \cdot \Delta t}$$

c_{Prot}	: Proteinkonzentration des Rohextraktes [mg/ml]
V_{RE}	: Volumen des eingesetzten Rohextraktes [ml]
Δt	: Reaktionszeit [min]

Meist handelt es sich bei den gezeigten Daten um Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die dazugehörige Standardabweichung.

- Overlay-Test

Zur qualitativen Bewertung der Promotoraktivitäten wurde der Overlay-Test genutzt. Dazu wurden die Stämme zunächst 2-3 Tage auf entsprechenden Minimalmedium-Platten angezogen (vgl. Wachstumstest Kapitel 2.2.1.4).

Für den Overlay wurden 50 ml 2x Overlay-Lösung frisch hergestellt und lichtgeschützt im Wasserbad auf 50 °C temperiert. 50 ml 1 % (w/v) „low-melting“-Agaroselösung wurden aufgekocht und ebenfalls auf 50 °C temperiert. Die beiden Lösungen wurden daraufhin unter Vermeidung von Luftblasen vermengt und die auf den Testplatten gewachsenen Stämmen damit vorsichtig überschichtet (je Platte etwa 12 ml). Die Platten wurden bis zum Erstarren der Agaroseschicht bei RT abgekühlt und dann bei 37 °C inkubiert. Die von den Zellen exprimierte β -Galaktosidase katalysiert die Spaltung des in der Agarosemischung enthaltenen Farbstoffes X-Gal. Die damit verbundene Blaufärbung wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und durch Scannen der Platten dokumentiert.

2.2.3.6 Aufnahmetest mit ^{14}C -markiertem Biotin

Der Aufnahmetest wurde nach Stolz *et al.* [1999] durchgeführt. Die Ernte der Zellen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} \sim 1$ in Minimalmedium). Nach je 1x Waschen mit kaltem Wasser bzw. kaltem Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4, wurden 1 OD_{600} Zellen in 1 ml Puffer aufgenommen und 1 min im Wasserbad bei 30 °C gerührt. Nach der Zugabe von 25 μl 40 % (w/v) Glukose zum Energetisieren der Zellen und einer weiteren Minute Inkubationszeit wurde der Aufnahmetest mit 10 μl ^{14}C -markiertem Biotin (Amersham CFB 253, spezifische Aktivität = 54 mCi/mmol, Endkonzentration 4 μM) gestartet. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden je 100 μl Testansatz über Nitrocellulosefilter abgesaugt und mit einem Überschuß an Wasser gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationslösung getaucht und die aufgenommene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.4 Bestimmung der Konzentration an freiem Biotin in *S. cerevisiae*

Die Bestimmung der Konzentration an freiem, d.h. nicht proteingebundenem Biotin in Hefe-Zellextrakten wurde mit Hilfe kompetitiver ELISA-Tests auf 96-Loch-ELISA-Platten durchgeführt. Die Platten wurden dazu vorher mit Biotinyl-BSA-beschichtet.

2.2.4.1 Herstellung von Biotinyl-BSA

Biotinyliertes BSA (Biotinyl-BSA) wurde nach Harlow und Lane [1999] hergestellt. Dazu wurden 5 mg Biotinamidocapronat N-Hydroxy-Succinimidester (Sigma # B2643) in Dimethylsulfoxid gelöst (6,67 mg/ml) und mit 25 mg BSA (Applichem # A0846, dialysiert gegen 4x 2 Liter Boratpuffer, 2 mg/ml) in 0,1 M Boratpuffer, pH 8,8, bei RT inkubiert. Nach 6 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μl 1 M NH_4Cl gestoppt und weitere 10 min inkubiert. Um ungebundenes Biotin zu entfernen, wurde die Reaktionslösung extensiv gegen 0,1 M Boratpuffer, pH 8,8, dialysiert (Spectra/Por® Dialysemembran, 12 - 14,000 MWCO) und die Konzentration des Biotinyl-BSA durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt ($A_{280} = 0,67$ entspricht 1 mg/ml BSA).

2.2.4.2 Zellextrakt zur Biotin-Bestimmung

30-100 OD Zellen wurden geerntet, 2x mit Wasser und 1x mit PBS gewaschen und das Pellet schließlich bei -20 °C aufbewahrt. Der proteinfreie Zellextrakt wurde dann nach Rogers und Lichstein [1969b] hergestellt. Dazu wurde das Zellpellet in 1-2 ml PBST resuspendiert und 10 min bei 95 °C unter Schütteln (700 rpm) gekocht. Die Zelltrümmer und denaturierte Proteine wurden durch eine anschließende Zentrifugation (Tischkühlzentrifuge, 5 min, 4 °C, 13500 rpm)

abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in den ELISA-Test zur Biotinbestimmung eingesetzt. Mittels Western Blot-Analyse (reversible Färbung der Membran mit Ponceau S und Dekoration mit Strep-PO) wurde bestätigt, dass die so erhaltenen Extrakte frei von Proteinen, insbesondere biotinylierten Proteinen, waren.

2.2.4.3 ELISA-Test

Die Biotinkonzentration der Hefezelleextrakte wurde unter Anlehnung an die Methode von Duval *et al.* [1994b] ermittelt. ELISA-Platten (Greiner # 655081) wurden je Vertiefung UN mit 100 µl 3 µg/ml Biotinyl-BSA-Lösung in PBS bei 4 °C beschichtet. Nach 1x Waschen mit PBST wurden die Platten mit 10 mg/ml unmarkiertem BSA in PBS für mindestens 1 h bei 25 °C blockiert und dann wieder 3x mit PBST gewaschen. Währenddessen wurden auf Mikrotiterplatten je 100 µl Strep-PO (Pierce # 21126) in einer Verdünnung von 1:10000 in PBST mit je 100 µl einer Biotinlösung in PBST für mindestens 1 h bei 25 °C inkubiert. Dabei wurden entweder Biotin-Standardlösungen oder die Zellextrakte in unterschiedlichen Verdünnungen (x µl Zellextrakt + 100-x µl PBST) eingesetzt. Daraufhin wurden je 100 µl der Strep-PO-Biotin-Ansätze auf die vorbereiteten ELISA-Platten überführt und 1 h bei 25 °C inkubiert. Nach 4x Waschen mit PBST wurde die Peroxidaseaktivität in den Löchern durch Spaltung von ABTS (Applichem, # A1088) und einer daraus resultierenden Grünfärbung der Reaktionslösung bestimmt. Dazu wurden die Löcher mit je 100 µl frischer ABTS-Lösung (nach [Shiuan *et al.*, 1997]) versetzt und die Platte bei RT gelegentlich geschüttelt. Durch Zugabe von 100 µl/Loch 0,002 M NaN₃ wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 405 nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

Die Biotinkonzentration in den Zellen wurde dann nach Duval *et al.* [1994b] wie folgt berechnet: Zunächst wurde mit Hilfe der Biotin-Standardkurve die minimale Biotinmenge bestimmt, die für die Sättigung der eingesetzten Strep-PO nötig ist und bei der keine Strep-PO-Bindung an die Biotinyl-BSA-beschichteten Platten erfolgt (vgl. Abb. 2-1). Dann wurden unterschiedliche Mengen an Zellextrakt in den Test eingesetzt. Hier wurden die zwei Volumina V_1 und V_2 bestimmt, die gerade noch bzw. schon nicht mehr für die Strep-PO-Sättigung ausreichten. Mit der oben erhaltenen Grenzbiotinmenge (Biotin_{min}) wurden dann die minimal und maximal möglichen Biotinkonzentrationen c_{min} und c_{max} im Zellextrakt berechnet. Der Test wurde jeweils mehrfach ausgeführt und ein Mittelwert mit Standardabweichung aus allen c_{min} und c_{max} -Werten gemeinsam ermittelt. Mit dem Gesamtvolumen des Zellextraktes, der Menge an aufgeschlossenen Zellen und einem angenommenen internen Zellvolumen von 11,25 µl/10 OD Zellen erhielt man schließlich die zelluläre Konzentration freien Biotins.

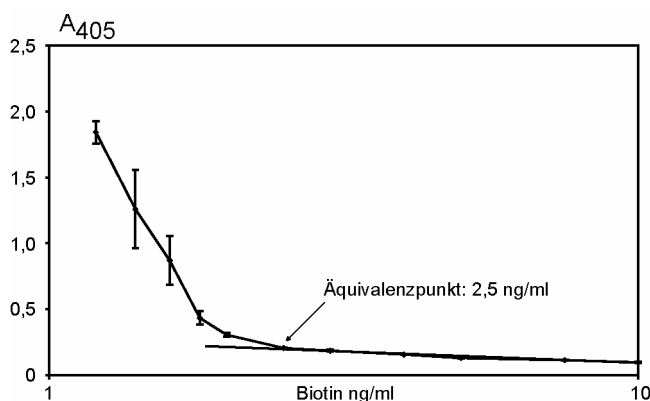


Abb. 2-1: ELISA-Biotin-Standardkurve. Zur Bestimmung der Grenzbiotinmenge wurden wie oben beschrieben je 100 µl von Biotinstandardlösungen in den ELISA-Test eingesetzt. Der Äquivalenzpunkt lag hier bei 2,5 ng/ml Biotin. Damit reichten 0,25 ng Biotin (= Biotin_{min}) zur Sättigung der verwendeten Strep-PO.

2.2.4.4 Prüfung der Spezifität des ELISA-Tests

Zur Überprüfung der Spezifität des Testverfahrens zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration freien Biotins wurde der ELISA-Test mit DTB, KAPA, Biotinyl-AMP (B-AMP) und DAB durchgeführt (Abb. 2-2).

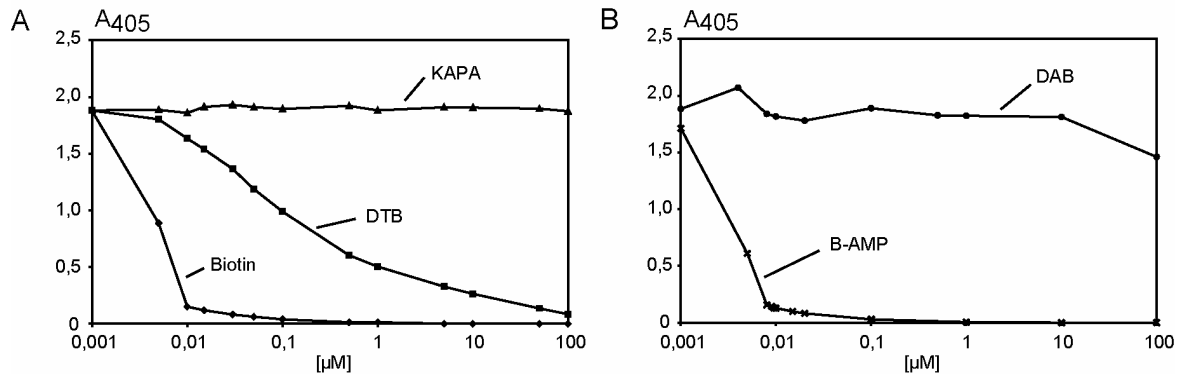


Abb. 2-2: Prüfung der Spezifität des ELISA-Tests. A, In den ELISA-Test wurden je 100 µl Biotin, DTB und KAPA in Konzentrationen von 0,001 µM bis 100 µM eingesetzt. B, Hier wurden DAB und B-AMP ebenfalls in Konzentrationen von 0,001 µM bis 100 µM untersucht.

Der Äquivalenzpunkt lag bei diesem Test bei einer Biotinkonzentration von 10 nM. Dies entspricht der bei Abb. 2-1 angegebenen Konzentration von 2,5 µg/l Biotin.

Würde DTB in der gleichen Konzentration wie Biotin in den Zellen vorliegen, würde es die Bestimmung an Biotin kaum stören (Abb. 2-2). KAPA und DAB haben gar keinen Einfluß auf das Testergebnis. Zwischen Biotin und Biotinyl-AMP kann in diesem Testverfahren allerdings nicht unterschieden werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Biotinmangelantwort auf Transkriptions- und Translationsebene

In vorangegangenen Arbeiten wurden die Plasmamembran-Biotinpermeasen in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* gefunden und charakterisiert [Stolz *et al.*, 1999; Stolz, 2003]. Es wurde gezeigt, dass die in beiden Hefen Vht1p („vitamin H transporter 1“) genannten Transporter in Abhängigkeit der Biotinkonzentration im Medium reguliert werden. So konnte man nach einer Anzucht bei geringer Biotinkonzentration eine deutliche Steigerung der *VHT1*-Expression beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die Biotinmangelantwort in *S. cerevisiae* näher untersucht. Dazu wurde zunächst geprüft, wie das Biotinmangelsignal auf der Transkriptionsebene übertragen wird.

3.1.1 Das BRE-Promotorelement als Vermittler der Biotinmangelantwort

3.1.1.1 Die BRE-Sequenz ist ein konserviertes DNA-Element in den Promotoren der Biotingene

Um eine konservierte DNA-Sequenz zu finden, an der das Biotinmangelsignal übertragen wird, wurden zuerst die *VHT1*-Promotoren von *S. cerevisiae* und anderer nah verwandter *Saccharomyces*-Stämme [Cliften P. *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003] verglichen. Zu diesen Stämmen gehörten die Spezies *S. paradoxus*, *S. mikatae* und *S. bayanus* aus der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe [Kellis *et al.*, 2003] und die evolutionär etwas weiter entfernte Hefe *S. castellii* aus der *Saccharomyces sensu lato*-Gruppe [Cliften P. F. *et al.*, 2001].

Der Sequenzvergleich der Promotoren führte zu der Identifizierung eines bislang unbekannten, konservierten, 20 bp langen DNA-Elements, welches BRE-Element („biotin response element“) genannt wurde und in allen untersuchten *Saccharomyces*-Spezies zu finden war (Abb. 3-1; Abb. 3-2A). Neben der BRE-Sequenz wurden in Abb. 3-1 die TATA-Box und die Transkriptionsfaktorbindestellen von Ino2p/Ino4p [Hoppen *et al.*, 2005], Gcn4p [Hill D. E. *et al.*, 1986a] und Aft1p [Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996] gekennzeichnet.

Abb. 3-1: *VHT1*-Promotor-Sequenzvergleich nah verwandter *Saccharomyces*-Arten. Ein konserviertes 20 bp DNA-Element, BRE genannt, wurde durch den Vergleich der Promotoren des Biotintransporters *VHT1* aus den nah verwandten Hefe-Spezies *S. cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces castellii* identifiziert. Des Weiteren wurden die TATA-Box und die Transkriptionsfaktorbindestellen von Ino2p/Ino4p, Gcn4p und Aft1p markiert. Die Nummerierung gibt die Position relativ zum Start-ATG (A gleich +1) des Gens an, Sternchen zeigen hoch konservierte Basen an. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von ClustalW 1.8 über BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) durchgeführt.

Neben dem *VHT1*-Gen sind vermutlich noch weitere Gene aus dem Biotinmetabolismus, hier als Biotingene bezeichnet, biotinabhängig reguliert. Die 5'-nichtcodierenden DNA-Sequenzen dieser Gene wurden daher ebenfalls auf das Vorhandensein eines BRE-Motivs überprüft. Tatsächlich wurde in den Promotoren des Biotinsynthasegens (*BIO2*) und des Biotin-Protein-Ligasegens (*BPL1*) ein ähnliches Element gefunden (Abb. 3-2B und C).

Der Abstand der BRE-Sequenzen zum jeweiligen Startcodon lag dabei in allen Fällen zwischen 236 bp und 371 bp.

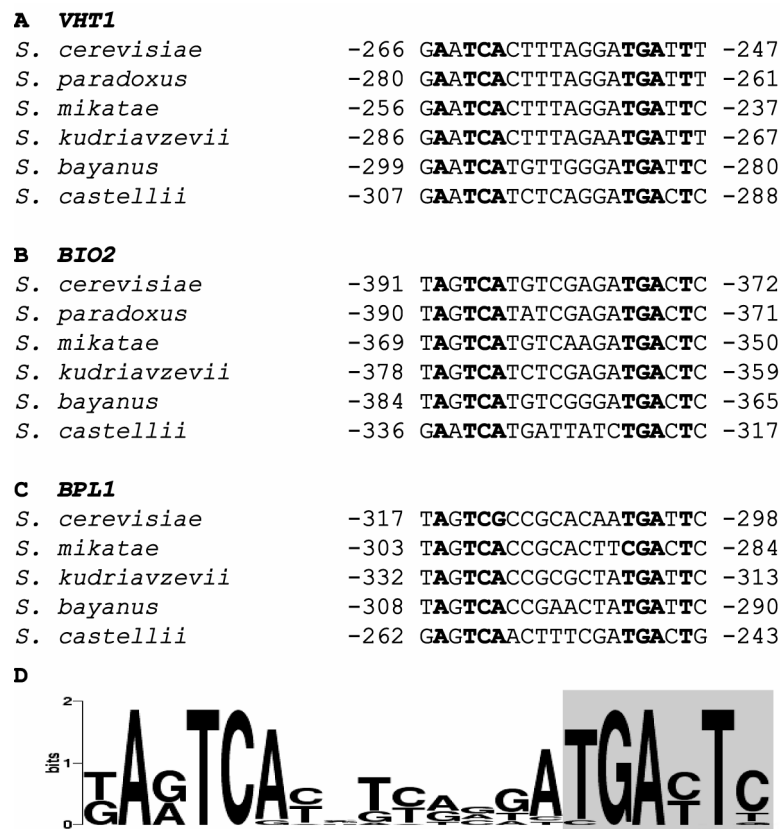


Abb. 3-2: Konservierte BRE-Sequenz in den Promotoren verschiedener Biotingene. *A-C*, Promotorvergleiche weiterer Gene aus dem Biotinmetabolismus. Das konservierte 20 bp BRE-Element aus dem Promotor des Biotintransporters *VHT1* (*A*) wurde auch in den Genen der Biotinsynthase *BIO2* (*B*) und der Biotin-Protein-Ligase *BPL1* (*C*) der verwandten Hefe-Spezies *S. cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces kudriavzevii* (gehört auch zur *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe; [Naumov G. I. et al., 2000]), *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces castellii* gefunden. Die Nummerierung gibt die Position relativ zum Start-ATG (A gleich +1) des Gens an. Die fett gedruckten Basen markieren die Positionen, die in mindestens 16 der 17 vorgestellten Sequenzen identisch sind. *D*, Graphische Darstellung der Konsensussequenz. Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) wurde mit den vorgegebenen Einstellungen zur graphischen Darstellung der Sequenzen aus *A-C* verwendet. Die Größe eines Buchstabens spiegelt hier dessen Häufigkeit in den aufgeführten Sequenzen wider. Die Basen, die die Kernsequenz einer Gcn4p-Bindestelle darstellen [Arndt und Fink, 1986], sind grau unterlegt.

Innerhalb der BRE waren die Basen unterschiedlich stark konserviert. Einige Positionen waren dabei sogar über 90% identisch (Abb. 3-2A-C). Der Konservierungsgrad der BRE-Basen ist in Abb. 3-2D graphisch dargestellt. Je größer der Buchstabe, desto häufiger war er in den

aufgeführten Sequenzen vertreten. Hier zeigt sich deutlich, dass die endständigen Positionen des BRE-Elements konservierter sind als die mittleren Nukleotide. Diese stark konservierten Bereiche der BRE bilden zudem ein Palindrom, das oft das Kennzeichen einer Transkriptionsfaktor-Bindestelle ist.

Man kann also zusammenfassen, dass bei nah verwandten *Saccharomyces*-Stämmen in den Promotoren verschiedener Gene aus dem Biotinmetabolismus eine konservierte DNA-Sequenz enthalten ist, die bei der Übertragung der Biotinmangelantwort eine Rolle spielen könnte.

3.1.1.2 Das BRE-Element ist nötig für die Biotinmangelantwort

Um die Bedeutung des BRE-Elementes in der Biotinregulation näher zu charakterisieren, wurden Reporterexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein *CEN*-Vektor (*VHT1-lacZ*), in dem die 760 bp des *VHT1*-Promotors vor dem Start-ATG (Promotorbereich -760 bis -1) mit dem *lacZ*-Gen fusioniert waren, als Reporterplasmid in einen *S. cerevisiae* Wildtypstamm transformiert. Die Zellen wurden dann in Medien mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen angezogen und der Hefe-Rohextrakt anschließend für β -Galaktosidase-Aktivitätstests eingesetzt (vgl. Kapitel 2.2.3.5). Die Biotinkonzentrationen betrugen dabei 2 $\mu\text{g/l}$ (Standardkonzentration im synthetischen Minimalmedium; „Normal-Biotin“), 0,2 $\mu\text{g/l}$ und 0,02 $\mu\text{g/l}$ (Abb. 3-3).

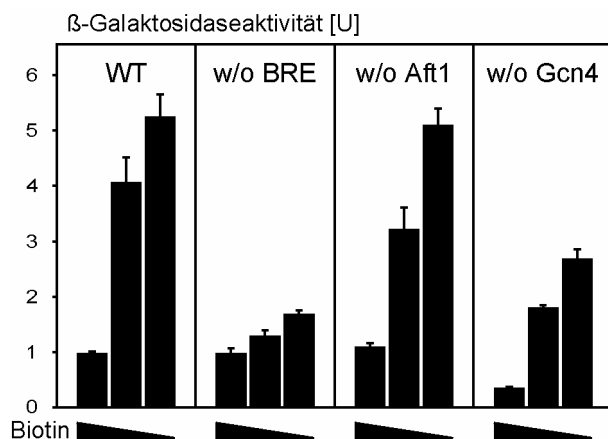


Abb. 3-3: Das BRE-Element übermitteln die biotinabhängige Expression von *VHT1*. Verwendet wurden W303-1A-Hefezellen mit dem unmodifizierten Reporterplasmid *VHT1-lacZ* (WT) oder mit modifizierten Plasmiden, bei denen die Bindestellen für Gcn4p (w/o Gcn4) oder Aft1 (w/o Aft1) bzw. die 20 bp BRE-Sequenz (w/o BRE) zerstört wurden. Mit dem Rohextrakt dieser Zellen wurde ein β -Galaktosidase-Aktivitätstest durchgeführt. Wie angedeutet wurden die Zellen dazu vor dem Test in Medien mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen (2, 0,2 und 0,02 $\mu\text{g/l}$ Biotin) angezogen.

Die in Normal-Biotin angezogenen Transformanten zeigten eine relativ geringe β -Galaktosidaseaktivität und damit auch eine schwache *VHT1*-Promotoraktivität (Abb. 3-3). Diese wurde aber bei Zellen aus Medium mit 0,2 $\mu\text{g/l}$ Biotin (1/10 der Standardkonzentration) 4,2x und nach Anzucht in 0,02 $\mu\text{g/l}$ Biotin (1/100 der Standardkonzentration) 5,4x gesteigert (Abb. 3-3).

Der Reportertest mit *VHT1-lacZ* spiegelte die bereits bekannte biotinabhängige Expression von *VHT1* [Stolz *et al.*, 1999] wider. Dieses Reportersystem war somit geeignet, die Biotinmangelantwort in den Zellen zu untersuchen.

Wie schon in Abb. 3-1 gezeigt, besitzt der *VHT1*-Promotor mehrere Transkriptionsfaktor-Bindestellen. So ist bekannt, dass *VHT1* Gcn4p-abhängig exprimiert wird [Natarajan *et al.*, 2001]. Gcn4p ist ein zentraler Transkriptionsfaktor im Aminosäuremetabolismus. Dabei ist die kanonische Gcn4p-Bindestelle (UAS_{GCRE} [Arndt und Fink, 1986; Hill D. E. *et al.*, 1986a]) im *VHT1*-Promotor (⁻¹¹⁰ATGACTCTT⁻¹⁰²), mit Ausnahme von *S. catellii*, in verwandten Hefen konserviert.

Ferner haben Shakoury-Elizeh *et al.* [2004] in genomweiten Analysen gezeigt, dass der *VHT1*-Promotor eine funktionelle Aft1p-Bindestelle enthält (⁻⁷⁰TACACCC⁻⁶⁴ [Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996]). Aft1p ist ein bedeutender eisenabhängiger Transkriptionsfaktor in Hefe [Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995] und könnte an der Erhöhung der *VHT1*-Expression bei Eisenmangel beteiligt sein [Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004]. Allerdings ist hier die Aft1p-Bindestelle in den *VHT1*-Promotoren der anderen sequenzierten nah verwandten *Saccharomyces*-Stämme nicht konserviert (Abb. 3-1).

Um zu überprüfen, ob Aft1p- bzw. Gcn4p-Bindestellen eine Bedeutung bei der Biotinmangelantwort haben, wurden diese jeweils einzeln im *VHT1-lacZ*-Reporter entfernt und erneut ein Reportertest durchgeführt. Die Bindestellen wurden dabei gegen zufällige Basen ausgetauscht, damit keine Verschiebung der restlichen Promotorelemente im Vergleich zum Start-ATG erfolgte.

Nach der Zerstörung der Gcn4p-Bindestelle konnte man einen allgemeinen Rückgang der β -Galaktosidaseaktivität beobachten (Abb. 3-3). Die Stimulierbarkeit des *VHT1*-Promotors ohne UAS_{GCRE} in Niedrig-Biotin blieb jedoch vorhanden (5,2x bzw. 7,8x).

Der Austausch der Aft1-Bindestelle beeinflusste die Promotoraktivität von *VHT1* kaum und die Induzierbarkeit der *lacZ*-Expression durch Anzucht in Niedrig-Biotin wurde nicht gestört (Abb. 3-3).

Ein weiteres Element im *VHT1*-Promotor ist die Bindestelle UAS_{ICRE} für die Transkriptionsfaktoren Ino2p/Ino4p (⁻⁴¹⁷CTTTCACATGG⁻⁴⁰⁷; [Schüller *et al.*, 1995; Hoppen *et al.*, 2005]). Ino2p/Ino4p wirken als heterodimere Aktivatoren bei einem Mangel an den Phospholipid-Vorläufern Inositol und Cholin und sind deshalb unter anderem sehr wichtig in der Regulation des Phospholipidmetabolismus [Henry und Patton-Vogt, 1998]. In einem Mikroarray-Experiment von Santiago und Mamoun [2003] waren bei Anwesenheit von Inositol/Cholin (IC) im

Medium sowohl die Expression von *VHT1* 3,9x reduziert als auch weitere Biotingene reprimiert. Gelretardationsstudien von Hoppen *et al.* [2005] zeigten zwar, dass Ino2p/Ino4p an den *VHT1*-Promotor binden, im *lacZ*-Reportertest wurde aber nur eine schwache IC-abhängige Regulation von *VHT1* gemessen. Eine weitere genomweite Transkriptomanalyse konnte die Beobachtungen von Santiago und Mamoun [2003] ebenfalls nicht bestätigen [Jesch *et al.*, 2005] und stimmte damit mit unserem Reportertest überein, in dem keine Änderung der *VHT1*-Promotoraktivität durch IC auftrat (Abb. 3-4). In diesem Test wurden Zellen mit dem *VHT1-lacZ*-Reporter zunächst in Medium mit IC angezogen und dann zwei Tage in Medium mit bzw. ohne zusätzliches IC überführt. Die Konzentrationen von Inositol und Cholin entsprachen dabei mit 50 μ M und 1 mM denen im Test von Santiago und Mamoun [2003]. Zum Vergleich enthält synthetisches Minimalmedium etwa 11 μ M Inositol und kein Cholin.

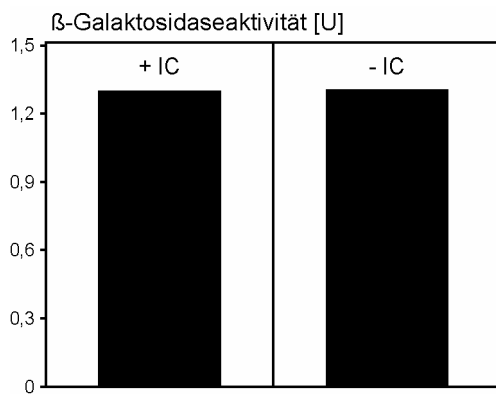


Abb. 3-4: *VHT1*-Expression in Abhängigkeit von Inositol und Cholin. Mit *VHT1-lacZ* in W303-1A WT-Zellen wurden Reportergentests durchgeführt. Vor dem Test wurden die Zellen zunächst 18 h in Minimalmedium mit 1 mM Cholin und 50 μ M Inositol angezogen und dann 51 h in Medium mit (+ IC) bzw. ohne zusätzliches IC (-IC) inkubiert. Hier erfolgte nur eine Einfachbestimmung der Werte.

Weil, ähnlich wie bei Aft1p, das UAS_{ICRE}-Element außerdem in den meisten *VHT1*-Promotoren der nah verwandten Hefen nicht konserviert ist (vgl. auch [Hoppen *et al.*, 2005]), erscheint es unwahrscheinlich, dass die Ino2p/Ino4p-Proteine Teil der Biotinmangelantwort sind.

Als nächstes wurde die in Kapitel 3.1.1.1 identifizierte BRE-Sequenz im *VHT1*-Promotor ausgetauscht und die Reportertests wiederholt. Dieses neue Konstrukt zeigte WT-Aktivität nach Anzucht der Zellen in Normal-Biotinmedium, konnte aber durch Biotinmangel kaum induziert werden (Abb. 3-3). Es war nur noch eine Aktivierung von 1,3x bzw. 1,7x zu beobachten.

Wie in Abb. 3-3 gezeigt, beeinflusste die Deletion der Gcn4p-Bindestelle im *VHT1*-Promotor die Induzierbarkeit in Niedrig-Biotin nicht. Bei genauerer Untersuchung des BRE-Elements konnte man vor allem in den hoch konservierten Sequenzbereichen Ähnlichkeiten zum kanonischen Gcn4p-Motiv feststellen (Abb. 3-2A und D). Um auszuschließen, dass das BRE-Element eine bisher unerkannte Gcn4p-Bindestelle darstellt, wurden Overlay-Reportertests (vgl. Kapitel 2.2.3.5) mit Zellen unter Histidinmangel, der eine Aktivierung des Gcn4p-Systems auslöst [Hope und

Struhl, 1985; Natarajan *et al.*, 2001], durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Reporterplasmid auf histidinfreien Minimalmedium-Platten plattiert und auf deren Mitte Histidin auf einem Filterplättchen ausgebracht, so dass sich auf den Platten ein Histidingradient bildete. Nach zwei Tagen Wachstum wurden die Zellen mit einer X-Gal enthaltenden Overlay-Lösung überschichtet. Die sich anschließende Umsetzung von X-Gal durch die von den Zellen exprimierte β -Galaktose führte zu einer Blaufärbung der Zellen und war damit ein qualitatives Maß für die Aktivität des zu untersuchenden Promotors.

In diesem Fall waren wie erwartet der WT-Reporter [Natarajan *et al.*, 2001], aber auch der *VHT1*-Promotor mit ausgetauschter BRE-Sequenz aktiviert (Abb. 3-5). Diese Stimulierung ging jedoch durch den Austausch der Gcn4p-Bindestelle verloren. Als Negativkontrolle wurde das Reporterplasmid *BIO2*-Promotor-*lacZ* eingesetzt. Der *BIO2*-Promotor wird nämlich nach Natarajan *et al.* [2001] nicht durch Gcn4p reguliert, obwohl *BIO2* sogar eine Gcn4p-Bindestelle in der Promotorregion enthält.

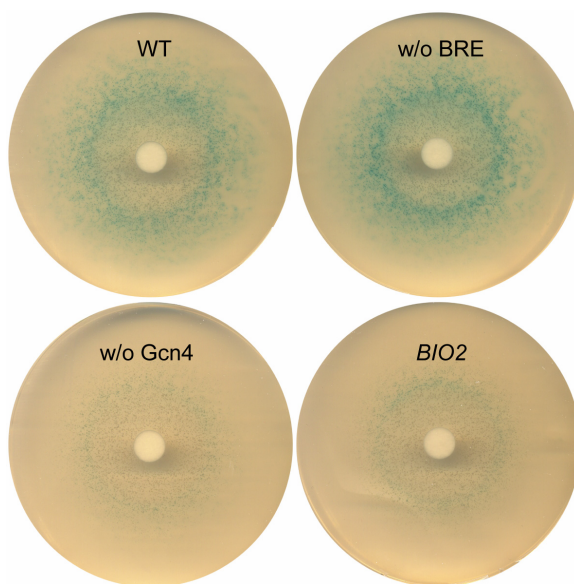


Abb. 3-5: Das BRE-Element stellt keine unerkannte Bindestelle für Gcn4p dar. Mit W303-1A-Stämmen, die als Reporterplasmide *VHT1-lacZ* (WT), *BIO2-lacZ* (*BIO2*) oder WT-Varianten mit ausgetauschter BRE-Sequenz (w/o BRE) bzw. zerstörter Bindestelle für Gcn4p (w/o Gcn4) trugen, wurden β -Galaktosidase-Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wurden die Zellen gleichmäßig auf histidinfreien Minimalmedium-Platten plattiert und auf deren Mitte ein mit Histidin getränktes Filterplättchen ausgebracht. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen mit Overlaylösung überschichtet und die sich anschließende Blaufärbung der Zellen nach 4,5 h dokumentiert.

Dieses Experiment bestätigte, dass *VHT1* durch Gcn4p reguliert wird und dass das oben aufgeführte Gcn4p-Element funktionell ist. Gleichzeitig wurde ausgeschlossen, dass die Biotinmangelantwort von *VHT1* durch Gcn4p vermittelt wird. Somit wurde die BRE-Sequenz als neuartiges Regulationselement identifiziert.

3.1.1.3 Das BRE-Element ist hinreichend für die Biotinmangelantwort

Als nächstes sollte bestätigt werden, dass das BRE-Element ausreichend für eine biotinabhängige Regulation eines Promotors ist. Dazu wurde ein neues Reporterplasmid, pMEL β 2, genutzt. Dieses ist ein *CEN*-Hefevektor, der das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle eines UAS-freien *MEL1*-Promotors (*MEL1* codiert eine α -Galaktosidase [Naumov G. *et al.*, 1990]) enthält. Der sogenannte Minimalpromotor ist inaktiv und die β -Galaktosidaseexpression kann erst nach Einführung von Transkriptionsaktivator-Bindestellen stimuliert werden [Melcher *et al.*, 2000].

Fragmente des *VHT1*-Promotors, die keine der Bindestellen für Ino2p/Ino4p, Gcn4p oder Aft1p enthielten, wurden mittels PCR amplifiziert und in den Minimalpromotor von pMEL β 2 integriert. Nach der Transformation der Konstrukte in Hefezellen wurde wie schon bei *VHT1-lacZ* die Reporteraktivität nach Anzucht in Normal- und Niedrig-Biotin gemessen (Abb. 3-6).

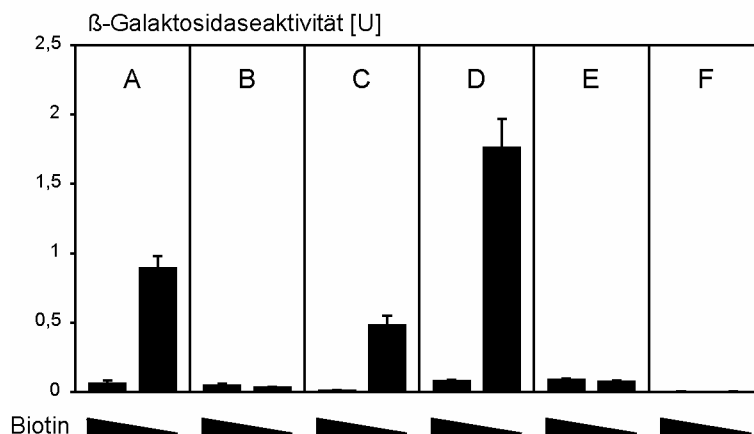
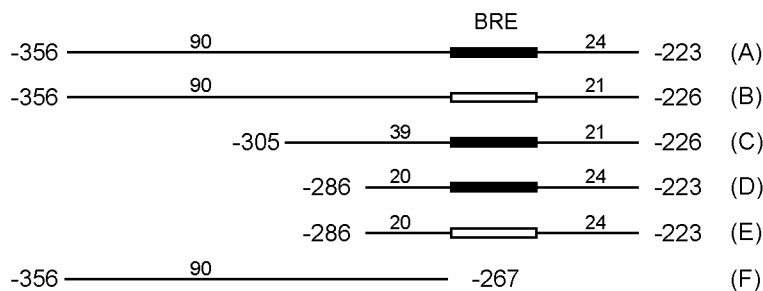


Abb. 3-6: Das BRE-Element aus *VHT1* bewirkt die biotinabhängige Regulation eines heterologen Promotors. Verschiedene Fragmente des *VHT1* Promotors (A-F) wurden durch PCR amplifiziert und fusioniert mit *lacZ* in den UAS-freien Promotor auf dem Plasmid pMEL β 2 kloniert. Die Abschnitte enthielten dabei keine der vorausgesagten Transkriptionsfaktorbindestellen von Aft1p, Gcn4p und Ino2p/Ino4p. Die Nummerierung gibt die Position relativ zum Start-ATG (A gleich +1) des *VHT1*-Gens an. W303-1A WT-Zellen, die die verschiedenen Reporterplasmide trugen, wurden nach der Anzucht (wie angezeigt) in Medium mit Normal-Biotin (2 μ g/l) bzw. Niedrig-Biotin (0,02 μ g/l) in β -Galaktosidase-Aktivitätstests eingesetzt.

Das Fragment, welches 134 bp des *VHT1*-Promotors einschließlich der BRE-Sequenz enthielt (Fragment A), führte zu einer 14,6x Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität in Niedrig-Biotin. Die Entfernung des BRE-Elements (Fragment B) bewirkte die Aufhebung der Aktivierung in Niedrig-Biotin. Daraufhin wurde das BRE-tragende Fragment auf 80 bp (Fragment C) und 63 bp (Fragment D) gekürzt. Beide Konstrukte vermittelten eine große Steigerung der *lacZ*-Expression

in Niedrig-Biotin (48,3x bei Fragment C und 22,3x bei Fragment D). Diese Antwort wurde durch Deletion des BRE-Elements aufgehoben (Fragment E). Ein Fragment, welches den ersten 90 bp des Fragmentes A entsprach, aber nicht bis in die BRE-Sequenz reichte (Fragment F), führte zu keiner Reporteraktivität.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass das BRE-Element eine die Biotinmangelantwort übertragende aktivierende Sequenz darstellt (UAS_{BIO}). Die BRE-Sequenz ist dabei sowohl die dominierende Biotin-Regulationsstelle im *VHT1*-Promotor als auch alleine ausreichend, um die Biotinmangelantwort in einem heterologen Promotor zu vermitteln.

3.1.1.4 Auch im *BIO2*-Promotor wird das Niedrig-Biotinsignal über das BRE-Element vermittelt

Beim Vergleich der BRE-Sequenzen aus Abb. 3-2 fiel auf, dass sich die Elemente aus den Promotoren von *BIO2* und *BPL1* zueinander etwas ähnlicher waren als jeweils der BRE-Sequenz aus *VHT1*. Deshalb wurde geprüft, ob auch das BRE-Element in *BIO2* funktionell und die Expression von *BIO2* biotinabhängig ist.

Wie im Falle von *VHT1-lacZ* wurde hier eine Fusion des *BIO2*-Promotors mit *lacZ* in einem *CEN*-Hefvektor erzeugt und in Hefe transformiert. Nach einer Anzucht in Niedrig-Biotin zeigten Hefen mit diesem Konstrukt eine 4,2x Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität (Abb. 3-7). Nach dem Austausch der BRE-Sequenz zeigten die Zellen keine Biotinmangelantwort. Im Vergleich zum WT-Plasmid waren etwas verminderte Reporteraktivitäten sowohl in Normal- als auch in Niedrig-Biotin zu beobachten (Abb. 3-7).

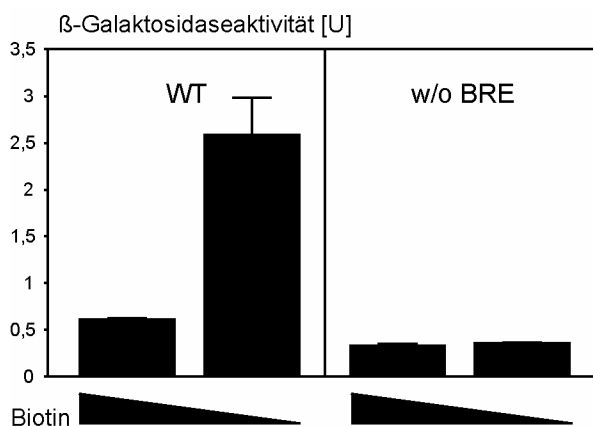


Abb. 3-7: Das BRE-Element ist nötig für die biotinabhängige Expression von *BIO2*. Mit W303-1A WT-Hefezellen, die das unmodifizierte *BIO2-lacZ* Reporterplasmid (WT) oder ein Reporterplasmid trugen, bei dem die 20 bp BRE-Sequenz zerstört wurde (w/o BRE), wurden β -Galaktosidase-Aktivitätstests durchgeführt. Die Zellen wurden wie angezeigt vor dem Test in Medium mit 2 bzw. 0,02 µg/l Biotin angezogen.

Damit wurde bestätigt, dass das BRE-Element allgemein als UAS_{BIO} bei Genen, die am Biotinmetabolismus beteiligt sind, die Biotinmangelantwort übermittelt.

3.1.2 Genomweite Suche nach durch Biotinmangel induzierten Genen

3.1.2.1 Biotinmangel induziert Gene des Biotinmetabolismus

Um zu erfahren, ob weitere Gene biotinabhängig reguliert werden, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Roche (Penzberg) von Jürgen Stolz und Heike Wöhrmann eine DNA-Microarray-Analyse durchgeführt [Pirner und Stolz, 2006]. Dabei wurde die Genexpression von *S. cerevisiae*-Zellen verglichen, die 6 h in Normal- und Niedrig-Biotinmedium angezogen wurden. Es wurde gezeigt, dass nicht nur *VHT1*, sondern auch alle anderen Gene aus dem Biotinmetabolismus bei Biotinmangel induziert waren (Abb. 3-8). Die Änderung der Transkriptionsaktivität war aber durchaus unterschiedlich. So wurde das KAPA/DAPA-Plasmamembranpermeasegen *BIO5* am stärksten induziert (12,9x). Mit abnehmender Induktionsstärke folgten *BIO2* (6,6x), *BIO4* (3,6x), das Gen der Biotinproteinligase *BPL1* (2,7x), *BIO3* (2,4x) und *VHT1* (1,7x). Die Expressionsniveaus der Gene der biotintragenden Proteine waren in beiden Medien etwa gleich stark. So wurden *ACCI* 1,1x, *HFAI* 1,1x, *DURI,2* 0,6x, *PYC1* 1,3x, *PYC2* 1,2x und *ARCI* 1,1x in Niedrig-Biotin induziert. Erwähnenswert ist auch, dass die *GCN4*-Expression nicht signifikant verändert wurde (1,3x Induktion). Über die Expression von *AFTI* liegen keine Daten vor.

Die obigen Daten wurden durch eine Northern Blot-Analyse untermauert [Pirner und Stolz, 2006], in der die Expressionsänderungen von *BIO5* (19,0x), *BIO2* (9,4x), *BPL1* (3,8x) und *VHT1* (2,1x) denen in der Microarray-Analyse ähnlich waren (Abb. 3-8). Dazu wurden von dem DNA-Microarray-Experiment unabhängige RNA-Präparationen verwendet.

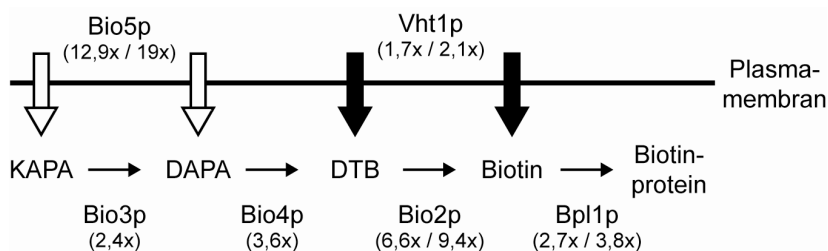


Abb. 3-8: Gesteigerte Expression der am Biotinmetabolismus beteiligten Gene nach Biotinmangel. Gezeigt ist eine schematische Präsentation des Biotinmetabolismus in *S. cerevisiae*. Die jeweils angegebenen Induktionsraten (Steigerung der Expression in Niedrig-Biotinmedium gegenüber Normal-

Biotinmedium) stammen aus einem DNA-Microarray-Experiment von Jürgen Stolz und Heike Wöhrmann in Zusammenarbeit mit der Firma Roche (Penzberg) [Pirner und Stolz, 2006]. Hier wurde die Genexpression von WT-Zellen nach 6h Anzucht in Normal-Biotinmedium (2 µg/l Biotin) bzw. Niedrig-Biotinmedium (0,02 µg/l Biotin) analysiert. Die Expression des Actingens *ACT1* (1,2x) war bei dem Test nicht signifikant verändert. Auch die Gene der biotintragenden Proteine wurden durch den Biotinmangel nicht induziert (1,1x *ACCI*; 1,1x *HFAI*; 0,6x *DURI,2*; 1,3x *PYC1*; 1,2x *PYC2* und 1,1x *ARCI*). Bei einigen Proteinen gibt ein zweiter Induktionswert die Expressionsunterschiede aus einem Northern Blot-Experiment von Sabine Laberer und Jürgen Stolz an [Pirner und Stolz, 2006].

Die Unterschiede zu den Werten der β -Galaktosidasetests, bei denen *VHT1* stärker als *BIO2* induziert wurde (5,4x gegenüber 4,2x), lassen sich vielleicht dadurch erklären, dass bei den β -Galaktosidasetests zwar die Aktivitäten der entsprechenden Promotoren bestimmt werden, Effekte von Genexpression und RNA-Stabilität jedoch keine Rolle spielen.

Zusammengefasst zeigen diese Analysen, dass nicht nur *VHT1* und *BIO2*, sondern auch das ebenfalls BRE-enhaltende Gen *BPL1* wie auch die Gene *BIO3*, *BIO4* und *BIO5* biotinabhängig regulierten werden.

Die Gene *BIO3*, *BIO4* und *BIO5* liegen in einem Cluster auf Chromosom XIV. Nach genauerer Untersuchung dieses Genomabschnitts konnte man auch in diesem Cluster BRE-verwandte Sequenzen finden, die jedoch innerhalb des offenen Leserahmens von *BIO4* lagen (Abb. 3-9). Diese putativen BREs wurden deshalb bei der ursprünglichen Suche innerhalb von Genzwischenregionen nicht identifiziert (vgl. Abb. 3-2).

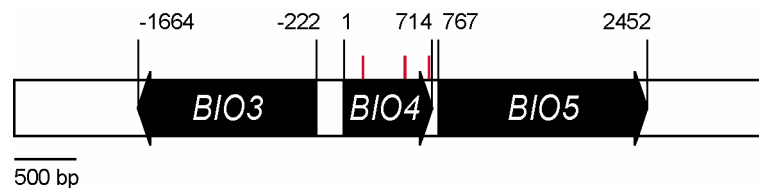


Abb. 3-9: Chromosomalen Lage von *BIO3*, *BIO4* und *BIO5* auf Chromosom XIV. Die Nummerierung gibt den Abstand relativ zum Start-ATG (A gleich +1) von *BIO4* an. Die roten Balken markieren die Positionen der putativen BRE-Sequenzen.

Die Elemente ¹⁴⁵GAGTCAGATCCAGGTGACTC¹⁶⁴ und ⁴⁸³GAATCATACATTGCTGACTT⁵⁰² (Nummerierung relativ zum *BIO4* Startcodon) waren in allen sequenzierten *Saccharomyces*-Arten konserviert (Abb. 3-10). Eine verwandte, aber kürzere Sequenz im 3'-Bereich der *BIO4*-Sequenz (⁶⁸²GAGTCATTAATGACCC⁶⁹⁷) war auch konserviert, fehlte jedoch in der Hefe *Saccharomyces kluyveri* (*Saccharomyces petite-negative*-Gruppe, evolutionär etwa genauso weit entfernt von *S. cerevisiae* wie die *sensu lato*-Gruppe [Cliften P. F. *et al.*, 2001]).

Bei der Sequenz mit der Position +145 bis +164 fiel auf, dass sie bezüglich des *BIO3*-Startcodons die Position -366 bis -385 einnahm und damit einen ähnlichen Abstand zu einem Startcodon besaß wie die Sequenzen aus *VHT1*, *BIO2* und *BPL1* (vgl. Abb. 3-2). An dieser Sequenz könnte also die biotinabhängige Regulation von *BIO3* stattfinden. Das Gleiche galt für *BIO5* und die Sequenz +483 bis +502, die -284 bis -265 Basen vom Startcodon des *BIO5*-Gens entfernt lag. Etwas ungewöhnlich ist die Regulation von *BIO4*, da UAS-Elemente normalerweise nicht von der Position innerhalb eines offenen Leserasters wirken [Struhl, 1989].

A			
<i>S. cerevisiae</i>	+145	GAGTCAGATCAAGGTGACTC	+164
<i>S. paradoxus</i>	+139	GAGTCAGATCAAGGTGACTC	+158
<i>S. mikatae</i>	+139	GAGTCAGATCAAGGTGACTC	+158
<i>S. kudriavzevii</i>	+139	GAGTCAGATCAAGGTGACTC	+158
<i>S. bayanus</i>	+145	GAGTCAGATCAAGGTGACTC	+164
<i>S. kluyveri</i>	+157	GAATCTGATCAAGGTGACAC	+176
		** ** *	
B			
<i>S. cerevisiae</i>	+483	GAATCATAACATTGCTGACTT	+502
<i>S. paradoxus</i>	+477	GAATCACACGTTGCTGACTT	+496
<i>S. mikatae</i>	+477	AAATCATAACCTTGCTGACAT	+496
<i>S. kudriavzevii</i>	+477	GAATCATAACGTTGCTGACGT	+496
<i>S. bayanus</i>	+483	GAATCATAACGATGCTTACAT	+502
<i>S. kluyveri</i>	+489	GAATCATACTCTGCTGACTT	+508
		***** ** ***** *	
C			
<i>S. cerevisiae</i>	+682	GAGTCATTAATGACCC	+697
<i>S. paradoxus</i>	+676	GAGTCATTAATGACCC	+691
<i>S. mikatae</i>	+676	GAGTCATTAATGACCC	+691
<i>S. kudriavzevii</i>	+676	GAGTCATTGATGACCC	+691
<i>S. bayanus</i>	+682	GAGTCGCTGATGACCC	+697
<i>S. kluyveri</i>	+689	AGACGATTCTTTAG--	+702
		***** * *****	

Abb. 3-10: Konservierte BRE-Sequenzen im offenen Leserahmen von *BIO4*. Innerhalb der offenen Leserahmen von *BIO4* aus *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* und *S. kluyveri* wurden zwei BRE-Elemente (A und B) und eine kürzere BRE-verwandte Sequenz (C) entdeckt. Die Nummerierung gibt den Abstand relativ zum Start-ATG (A gleich +1) von *BIO4* an. Die Sternchen zeigen in (A) und (B) die in allen aufgeführten Spezies identischen Positionen an, in (C) wurde *S. kluyveri* ausgenommen.

Eine weitere BRE-Sequenz war in der Promotorregion von *BIO6* zu erkennen (⁻²⁶¹GAGTCATGCAGTGCTGATTC⁻²⁴²; Nummerierung relativ zum Start-ATG). *BIO6*, welches ebenfalls biotinabhängig reguliert wird [Wu H. *et al.*, 2005], wurde 2005 in den biotinprototrophen Sake-Hefestämmen, die zu den *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen gezählt werden, entdeckt und ist nach Wu *et al.* [2005] ein neues Gen in der Biotinbiosynthese (Gen der KAPA-Synthase). Zu *BIO6* homologe Gene wurden auch in den anderen sequenzierten *Saccharomyces sensu stricto*-Stämmen gefunden [Wu H. *et al.*, 2005]. In der Promotorregion des zu *BIO6* homologen Gens in *S. bayanus* konnte man ebenfalls eine BRE-Sequenz identifizieren.

Schließlich war auch in der Promotorregion von *BIO1*, dem mutmaßlichen Pimeloyl-CoA-Synthasegen in biotinprototrophen *S. cerevisiae*-Stämmen [Hall und Dietrich, 2007], eine BRE-Sequenz (⁻⁴²⁸TAATCACATGCCCCATGACTT⁻⁴⁰⁹; Nummerierung relativ zum Start-ATG) enthalten (Sequenzdaten von Fred Dietrich; Duke University Medical Center, USA). Über die Regulation von *BIO1* ist bislang nichts bekannt.

Zu den ursprünglich entdeckten BRE-Sequenzen in den Promotoren von *VHT1*, *BIO2* und *BPL1* wiesen die neu gefundenen Elemente eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der Sequenz als auch der Position zu einem Startcodon auf. Angesichts dessen ist es sehr gut möglich, dass diese Elemente die biotinabhängige Expression von *BIO3*, *BIO5*, *BIO6* und vermutlich auch *BIO4* vermitteln.

3.1.2.2 Biotingene zeigen auch auf Proteinebene eine biotinabhängige Induktion

Eine weitere offene Frage war, ob die Unterschiede in der Genexpression der Biotingene, die im Mikroarray-Experiment, Northern Blot und den Reportertests erhalten wurden, auch wirklich in einer Änderung der Proteinmengen resultierten. Um dies zu prüfen, wurden Proteinextrakte aus Zellen, die genomisch markierte Versionen von *BIO5* und *VHT1* trugen, mittels Western Blot-Analyse untersucht. Ebenfalls analysiert wurde die Expression von Bio2p, für das ein spezifisches Antiserum verfügbar war (Abb. 3-11A).

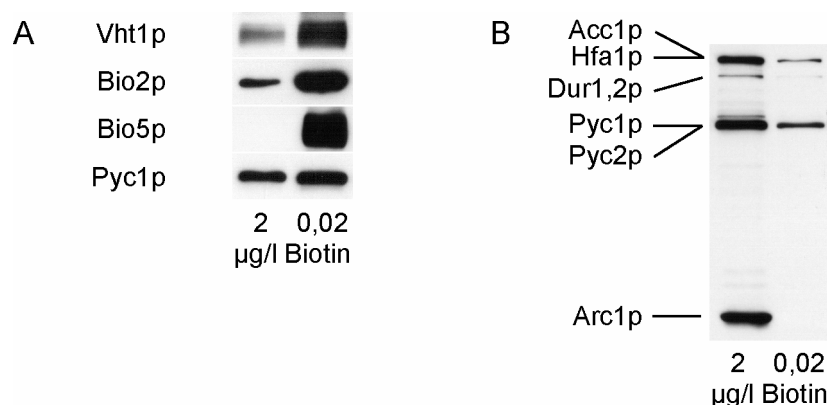


Abb. 3-11: Expression der Biotingene auf Proteinebene. *A*, Zur Untersuchung der Induktion verschiedener Proteine aus dem Biotinmetabolismus wurden Western Blot-Analysen mit Gesamtproteinextrakten aus Hefezellen nach 6 h Wachstum bei den angegebenen Biotinkonzentrationen durchgeführt. Detektiert wurden Vht1p-3HA, Bio5p-9Myc, Bio2p und Pyc1p-3HA. *B*, Western Blots mit den gleichen Extrakten aus (*A*) wurden zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO dekoriert. Acc1p und Hfa1p sowie Pyc1p und Pyc2p besitzen jeweils ähnliche Molekulargewichte und trennen sich deshalb nicht ausreichend im SDS-Gel.

In den Western Blots wurde deutlich, dass in Niedrig-Biotin gewachsene Zellen eine größere Menge an Vht1p, Bio2p und Bio5p, aufwiesen, wobei Bio5p in den Zellen aus Normal-Biotin nicht detektierbar war und am stärksten durch Biotinmangel induziert wurde (Abb. 3-11A). Mit der sehr starken Bande in Zellen aus Niedrig-Biotin blieb es also auch auf Proteinebene das am höchsten induzierte Biotingen. Die Steigerung der Vht1p-Menge durch Biotinmangel passt schließlich gut zur Tatsache, dass Wachstum in Niedrig-Biotin die Aktivität der Biotinaufnahme

erhöht [Rogers und Lichstein, 1969a; Stolz *et al.*, 1999]. Die kaum vorhandene Aktivierung der Genexpression biotintragender Proteine wurde in diesem Test am Beispiel der Pyc1p überprüft. Aus Abb. 3-11A geht deutlich hervor, dass die Proteinmenge von Pyc1p in Niedrig-Biotin nur äußerst schwach erhöht war.

Damit kann man es als gesichert ansehen, dass alle oben getesteten Proteine des Biotinmetabolismus, nicht aber die biotintragenden Enzyme, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bei Biotinmangel stärker exprimiert werden.

Weiterhin wurden Western Blots zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO dekoriert (Abb. 3-11B). Auffällig ist, dass ein Wachstum in Niedrig-Biotin zu schwächeren Banden aller biotintragenden Proteine führte, was auch schon bei *vht1Δ*-Mutanten beobachtet wurde [Stolz *et al.*, 1999]. Da Hefezellen keine Biotinidase besitzen, ist eine Entfernung des Biotins von den jeweiligen Proteinen unwahrscheinlich. Biotinidase ist ein menschliches Enzym, welches Biotin wieder von den Proteinen abtrennen kann [Hymes und Wolf, 1996]. Da sich außerdem die Genexpression der biotintragenden Proteine bei Biotinmangel nicht wesentlich (vgl. Legende von Abb. 3-8A) ändert, deuten die Daten darauf hin, dass die intrazelluläre Biotinkonzentration nach Wachstum der Zellen in Niedrig-Biotin zu gering ist, um die Zielproteine ausreichend zu biotinylieren.

Diese Hypothese wird durch die mittels ELISA-Test (vgl. Kapitel 2.2.4) in WT-Zellen bestimmten intrazellulären Konzentrationen an freiem Biotin gestützt. Diese betrugen nach einem Wachstum in Normal-Biotin (2 µg/l) 0,5-0,55 ng Biotin/µl Zellvolumen (Tab. 3-1 und Tab. 3-4, Seite 79). Dagegen verringerte sich die Biotinkonzentration innerhalb von Zellen, die unter Biotinmangel gewachsen waren, auf 0,03-0,05 ng Biotin/µl Zellvolumen.

Hefestamm	Intrazelluläre Konzentration freien Biotins [ng/µl]	
	Normal-Biotinmedium	Niedrig-Biotinmedium
W303-1A	0,50 ± 0,08	0,053 ± 0,004
BY4742	0,55 ± 0,22	0,03 ± 0,008

Tab. 3-1: Intrazelluläre Konzentrationen freien Biotins in WT-Hefe. Die WT-Stämme W303-1A bzw. BY4742 wurden in Medium (wie angegeben) mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen (Normal: 2 µg/l Biotin; Niedrig: 0,02 µg/l Biotin) angezogen. Der Test zur Bestimmung der intrazellulären freien Biotinkonzentration wurde wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

Es muss zwar beachtet werden, dass Biotin die RNA-Translation der biotintragenden Proteine beeinflussen könnte, dies konnte aber zumindest bei den beiden Isoformen der Pyruvatcarboxylasen Pyc1p und Pyc2p ausgeschlossen werden (Abb. 3-11A, Abb. 3-27).

In Abb. 3-11B fällt auf, dass die Veränderungen in der Biotinylierung bei den einzelnen biotintragenden Proteinen unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Die geringste Auswirkung hatte der Biotinmangel auf Pyc1p und Pyc2p, wenngleich der Effekt bei Acc1p/Hfa1p ähnlich war. Dagegen war Biotinyl-Arc1p, ein Protein mit einer nichtkanonischen Biotinbindestelle ([Kim H. S. *et al.*, 2004]), am stärksten vom Biotinmangel betroffen. Unter Niedrig-Biotinbedingungen war die Detektion von Holo-Arc1p nicht mehr möglich (Abb. 3-11B). Auch wenn man Unterschiede in der RNA-Translation oder der RNA- bzw. Proteinstabilität nicht ausschließen kann, ist es wahrscheinlicher, dass die Affinitäten der Apoproteine zur Biotin-Protein-Ligase Bpl1p und damit die Effektivität der Biotinylierung der Zielproteine differieren.

Es kann somit festgehalten werden, dass Biotinmangel zu einem Biotinylierungsdefekt und zu einer Verringerung der freien intrazellulären Biotinkonzentration in den Zellen führt, obwohl gleichzeitig der Biotintransporter, die Biotinbiosynthesenzyme und die Biotin-Protein-Ligase verstärkt exprimiert werden.

3.2 Suche nach dem Signalgeber der Biotinmangelantwort

Zur Aufklärung der Biotinmangelantwort in *S. cerevisiae* wurde im Folgenden untersucht, wie Hefezellen einen Mangel an Biotin wahrnehmen und das Signal vom Ort der Wahrnehmung an die Promotoren der Zielgene weiterleiten können.

3.2.1 Biotinwahrnehmung ist unabhängig von der extrazellulären Biotinkonzentration

Zunächst wurde geprüft, ob für die Wahrnehmung eines Biotinmangels die Konzentration des extra- oder des intrazellulären Biotins bestimmend ist.

Für diesen Zweck wurden Zellen im β -Galaktosidasetest eingesetzt, denen der Plasmamembran-Biotintransporter Vht1p fehlte. Diese *vht1Δ*-Deletionsmutanten besitzen gegenüber WT-Zellen eine verringerte cytoplasmatische Biotinkonzentration und können nur unter hohen Außenkonzentrationen an Biotin (200 μ g/l Biotin im Medium) gezogen werden [Stolz *et al.*, 1999]. Das Ergebnis des Reportertests mit *VHT1-lacZ* zeigt Abb. 3-12A.

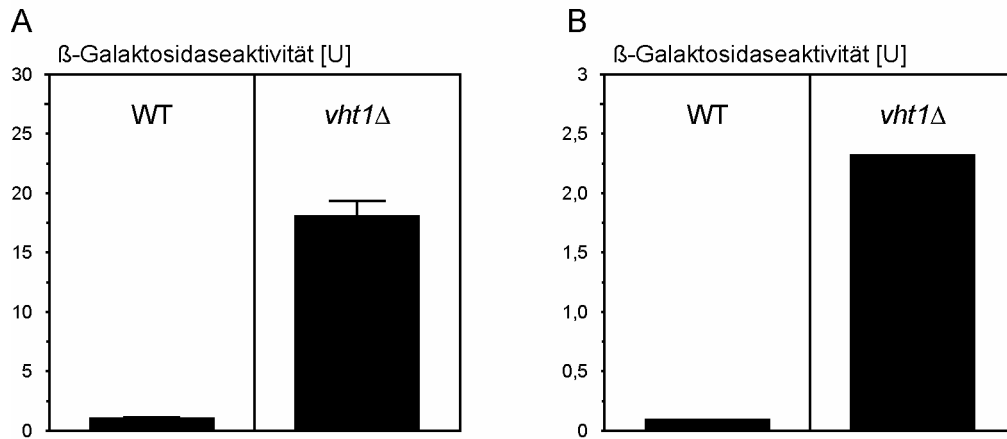


Abb. 3-12: Erhöhte Reporteraktivitäten von *vht1Δ*-Mutanten. *A*, β-Galaktosidasetests wurden mit *VHT1-lacZ* in W303-1A WT-Zellen (WT) und in einem isogenen *vht1Δ*-Stamm durchgeführt. Beide Stämme wurden dazu in Medium mit 200 µg/l Biotin angezogen. *B*, Die Tests aus (*A*) wurde mit pMELβ2-Fragment D als Reporterplasmid in W303-1A WT-Zellen (WT) und in einem isogenen *vht1Δ*-Stamm wiederholt. Hier erfolgte nur eine Einfachbestimmung der Werte.

In Übereinstimmung mit Abb. 3-3 zeigten WT-Zellen, die unter hohen Biotinkonzentrationen angezogen wurden, eine geringe Reporteraktivität (Abb. 3-12A). Bei *vht1Δ*-Mutanten aus dem gleichen Medium war die β-Galaktosidaseaktivität dagegen stark erhöht (18x).

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse durch andere Elemente des *VHT1*-Promotors als der BRE-Sequenz beeinflusst wurden, wurde pMELβ2-Fragment D (vgl. Abb. 3-6) als Reporterplasmid in WT und *vht1Δ*-Zellen transformiert und erneut ein β-Galaktosidasetest durchgeführt (Abb. 3-12B). Dieser ergab ähnliche Resultate wie der Test mit *VHT1-lacZ*. Diesmal war die β-Galaktosidaseaktivität von *vht1Δ*-Mutanten 29x gegenüber der aus WT-Zellen gesteigert.

Die Konzentration intrazellulären freien Biotins wurde wieder mittels ELISA-Test überprüft. Sie betrug bei WT-Zellen, angezogen in Hoch-Biotin (diesmal bei einer Konzentration von 20 µg/l Biotin), 12,8 ng Biotin/µl Zellvolumen (Tab. 3-4, Seite 79). Bei *vht1Δ*-Zellen war sie trotz Anzucht bei 200 µg/l Biotin auf 0,053 ng Biotin/µl Zellvolumen verringert (Tab. 3-4, Seite 79). Damit haben *vht1Δ*-Zellen nach Anzucht in Hoch-Biotin und WT-Zellen nach Anzucht in Niedrig-Biotin etwa die gleichen niedrigen Konzentrationen intrazellulären freien Biotins, die in beiden Fällen mit hohen Reporteraktivitäten einhergehen.

Eine weitere Beobachtung war, dass *vht1Δ*-Mutanten auf Platten mit hohen Biotinkonzentrationen ähnlich schlecht wuchsen wie WT-Zellen auf niedrigen Biotinkonzentrationen (Abb. 3-13A). Dieses Phänomen trat auch schon bei *S. pombe*-Zellen auf [Stolz, 2003] und zeigt, dass die

Bedingungen, die zu hohen Reporterogenaktivitäten führen, mit eingeschränktem Wachstum korrelieren.

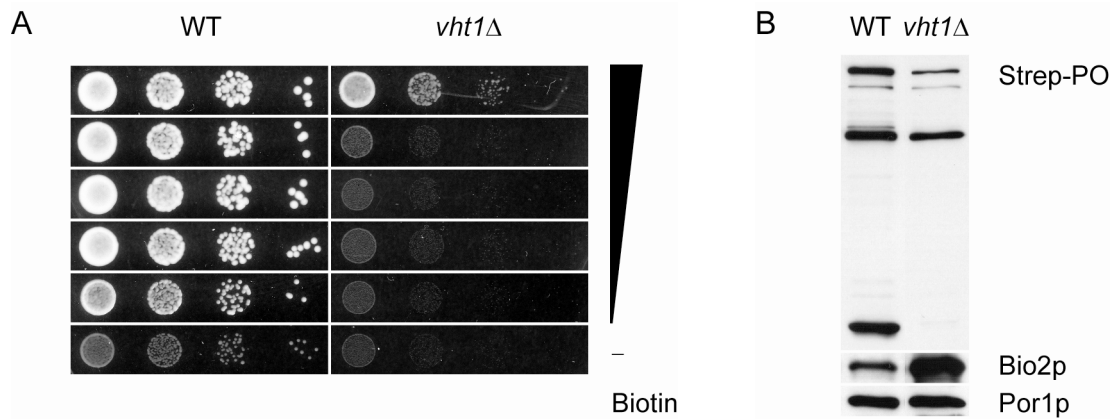


Abb. 3-13: Wachstum und Proteinbiotinylierung von *vht1Δ*-Mutanten. *A*, Die Stämme W303-1A WT- (WT) und *vht1Δ* (*vht1Δ*) wurden auf Platten mit 200, 20, 2, 0.2, 0.02 und 0 μg/l Biotin (von links nach rechts wie angezeigt) in unterschiedlichen Verdünnungen ausgebracht (vgl Kapitel 2.2.1.4) und das Wachstum nach 2 Tagen Inkubation bei 30° C dokumentiert. *B*, Aus in (*A*) genutzten Stämmen wurden Proteinextrakte mittels Western Blot analysiert. Die Blots wurden zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO oder Seren gegen Bio2p bzw. Por1p (mitochondrielles Porin; Beladungskontrolle) dekoriert. Vor dem Test wurden die Zellen in 2 μg/l Biotin (WT) bzw. 200 μg/l Biotin (*vht1Δ*) angezogen.

Wie der Western Blot in Abb. 3-13B zeigt, war auch die Biotinylierung der biotintragenden Enzyme in den *vht1Δ*-Mutanten herabgesetzt, was wiederum im Einklang mit früheren Ergebnissen von *vht1*-Punktmutanten [Stolz *et al.*, 1999] steht. Die Stärke der Banden war vergleichbar mit der Stärke der Biotinprotein-Banden von WT-Zellen nach Anzucht in Biotinmangelmedium (Abb. 3-11B). Dies dürfte der Grund für den Wachstumsdefekt von *vht1Δ*-Mutanten sein.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass niedrige Konzentrationen freien intrazellulären Biotins sowohl zu einer Reduzierung der Proteinbiotinylierung und zu einem verringerten Wachstum als auch zu erhöhten Reporterogenaktivitäten und damit zu einer Aktivierung des *VHT1*-Promotors führen. Außerdem ist ausgeschlossen, dass die Expression biotinregulierter Gene durch extrazelluläres Biotin beeinflusst wird, denn seine Konzentration korreliert nicht mit den beobachteten Reporteraktivitäten.

3.2.2 Mangel an KAPA führt zu einer typischen Biotinmangelantwort

Um die bisherigen Ergebnisse mit *vht1Δ*-Mutanten zu festigen, musste allerdings noch die Frage geklärt werden, ob der Plasmamembran-Biotintransporter Vht1p nicht selbst an der Biotinwahrnehmung beteiligt ist. Dazu wurden *vht1Δ*-Zellen in Medium mit KAPA statt Biotin angezogen und wiederum Reportertests durchgeführt. KAPA ist eine Vorstufe von Biotin und kann von Bäckerhefe über die Enzyme Bio3p, Bio4p und Bio2p in Biotin umgewandelt werden. Es zeigt keine strukturelle Verwandtschaft zu Biotin (Abb. 3-14) und wird über das Transporterprotein Bio5p aufgenommen [Phalip *et al.*, 1999]. Es wurde geprüft, ob KAPA die Biotinmangelantwort induzieren kann und ob dazu der Transporter Vht1p benötigt wird.

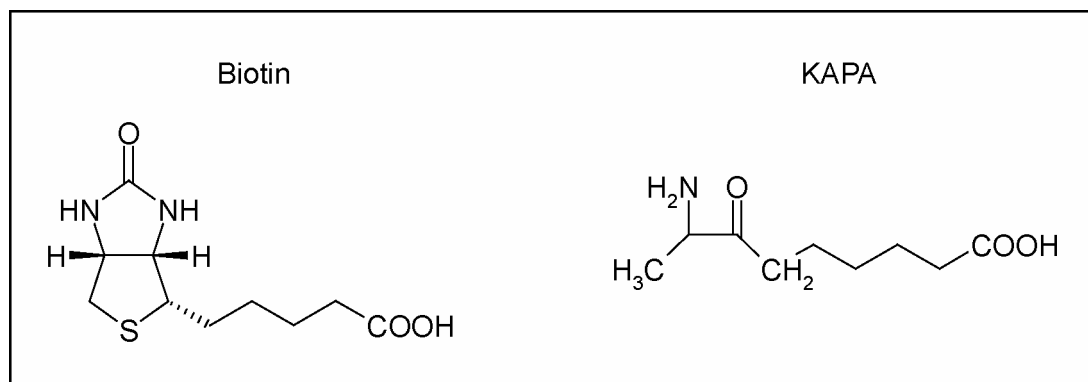


Abb. 3-14: D(+)-Biotin und KAPA

Zur Verarmung der Hefen an intrazellulärem Biotin, wurden WT- und *vht1Δ*-Zellen vor dem Experiment mehrere Tage in Medium mit 2 µg/l KAPA und die letzte Nacht in 20 µg/l KAPA kultiviert. Daraufhin wurden die Kulturen analog der biotinabhängigen Reportertests auf Medium mit 20 bzw. 0,2 µg/l KAPA aufgeteilt. Nach 6-stündigem Wachstum wurden jeweils die β-Galaktosidaseaktivitäten ermittelt. Die Steigerung der Reportergenaktivitäten nach Anzucht in Niedrig-KAPA war bei WT-Zellen (2,4x) und *vht1Δ*-Zellen (2,9x) vergleichbar (Abb. 3-15A).

Das zeigt, dass ein Mangel an KAPA zu einer Aktivierung eines biotininduzierbaren Promotors führt und zwar unabhängig davon, ob der Transporter Vht1p in den Zellen vorhanden ist. Damit kann eine direkte Beteiligung von Vht1p bei der Wahrnehmung von Biotinmangel ausgeschlossen werden.

Im Vergleich mit den biotinabhängigen β-Galaktosidasetests von WT-Zellen fiel außerdem auf, dass selbst bei einem Überschuss an KAPA eine relativ hohe Grundexpression des Reportergens vorhanden war. Diese Aktivierung des Biotinsystems ist zum einen damit zu erklären, dass die Expression der Gene des Biotinmetabolismus zur Umwandlung von KAPA in Biotin auch bei

hohen KAPA-Konzentrationen gewährleistet sein muss. Zum anderen könnte KAPA vielleicht von den Hefezellen schlechter aufgenommen werden als Biotin oder die Umwandlung von KAPA in Biotin erfolgt zu langsam.

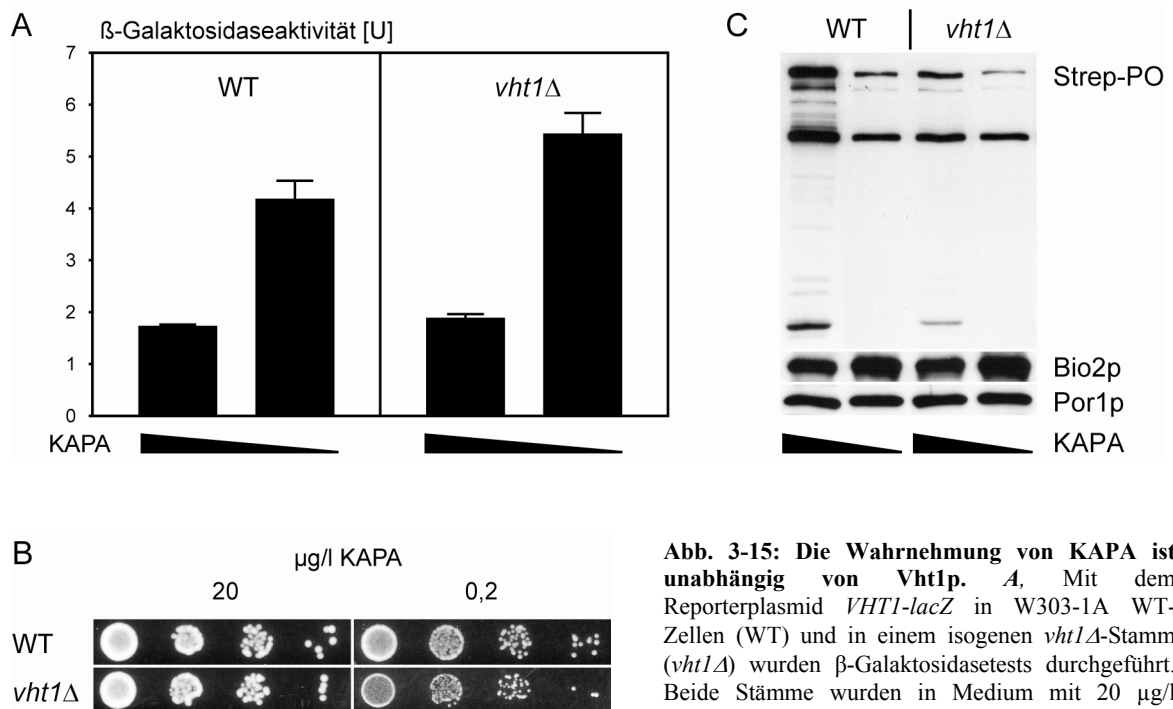


Abb. 3-15: Die Wahrnehmung von KAPA ist unabhängig von Vht1p. *A*, Mit dem Reporterplasmid *VHT1-lacZ* in W303-1A WT-Zellen (WT) und in einem isogenen *vht1* Δ -Stamm (*vht1* Δ) wurden β -Galaktosidasetests durchgeführt. Beide Stämme wurden in Medium mit 20 μ g/l KAPA angezogen und dann für 6 h im Medium mit 20 bzw. 0,2 μ g/l KAPA (wie angezeigt) überimpft.

B, Das Wachstum der Stämme aus (*A*) wurde auf Platten mit den angegebenen Konzentrationen KAPA getestet. Die Dokumentation erfolgte nach 2 Tagen Inkubation bei 30° C. *C*, Proteinextrakte aus den Zellen von (*A*) wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Blots wurden zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO oder Seren gegen Bio2p bzw. Por1p (Porin; Beladungskontrolle) dekoriert.

Zur weiteren Beurteilung des Verhaltens der KAPA-adaptierten Zellen wurden Wachstumstests auf Platten mit 20 bzw. 0,2 μ g/l KAPA durchgeführt. Dabei zeigten beide, WT- und *vht1* Δ -Zellen, auf hohen KAPA-Konzentrationen ein ähnlich gutes Wachstum, das jeweils auf Platten mit Niedrig-KAPA abnahm (Abb. 3-15B). Auch bei der Kontrolle der Proteinbiotinylierung ergaben sich vergleichbare Verhältnisse wie bei den Tests mit Biotinmedium (Abb. 3-11). Für die Western Blot-Analyse wurden Proteinextrakte aus den für die Reportertests angezogenen Zellen verwendet. Sowohl WT- als auch *vht1* Δ -Zellen zeigten schwächere Banden der biotintragenden Proteine und eine gleichzeitig erhöhte Expression von Bio2p nach dem Wachstum in KAPA-Mangelmedium (Abb. 3-15C).

In diesem Zusammenhang war außerdem interessant, ob auch DTB ähnlich wie KAPA die Expression der Biotingene regulieren kann. In diesem Fall wurden WT-Zellen mit *bio2Δ*-Mutanten verglichen. Die Biotinsynthase Bio2p katalysiert den letzten Schritt der Biotinbiosynthese, die Umwandlung von DTB in Biotin. Daher konnten die *bio2Δ*-Mutanten DTB nicht mehr als Biotinquelle nutzen, wohingegen WT-Zellen in Medium mit DTB etwa genauso gut wie in Medium mit Biotin wuchsen. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die Reportertests jeweils über Nacht in Biotinmedium gezogen und nach Aufteilung der Kulturen in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Biotin bzw. DTB überführt.

Bei diesen Tests war das Verhalten der WT-Zellen nach Anzucht in Normal- bzw. Niedrig-DTB vergleichbar mit dem in Normal- bzw. Niedrig-Biotin (Abb. 3-16). Das heißt, sowohl niedrige Konzentrationen an Biotin als auch an DTB steigerten die Expression des Reportergens. Die *bio2Δ*-Deletionsmutanten zeigten nur in Biotinmedium die bekannte Biotinmangelreaktion. Nach deren Anzucht in Medium mit hohen DTB-Konzentrationen wurde eine hohe β -Galaktosidaseaktivität gemessen, die durch einen Mangel an DTB nur noch wenig gesteigert werden konnte (Abb. 3-16).

Ähnlich wie bei einem früheren β -Galaktosidasetest nach Anzucht der Zellen in KAPA-Medium (vgl. Abb. 3-15A), konnte man eine etwas erhöhte Reporteraktivität nach Inkubation der WT-Zellen in Normal-DTB im Vergleich zu Normal-Biotin beobachten. Dies spiegelt vielleicht auch hier die Notwendigkeit wider, dass zumindest die Expression von *BIO2* bei Wachstum auf DTB aktiviert sein muss.

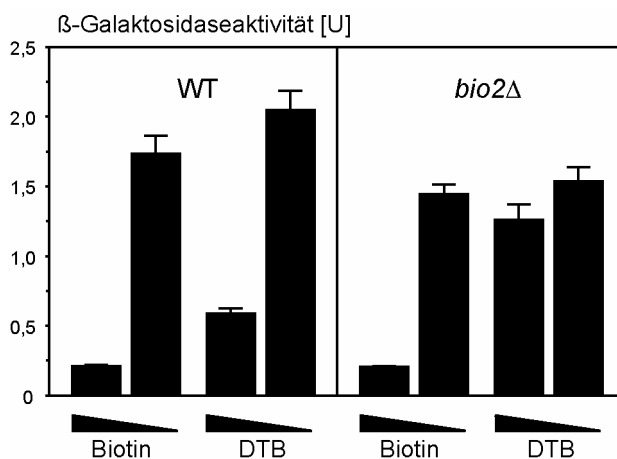


Abb. 3-16: Die Rolle von DTB bei der Expression der Biotingene. Mit BY4742 WT-Zellen und isogenen *bio2Δ*-Mutanten wurden β -Galaktosidasetests mit *VHT1-lacZ* als Reporterkonstrukt durchgeführt. Vor dem Test wurden beide Stämme zunächst in 2 μ g/l Biotin angezogen und dann für 6 h auf Medium mit 2 bzw. 0,02 μ g/l Biotin bzw. DTB aufgeteilt.

Bei *bio3Δ*- und *bio4Δ*-Stämmen, bei denen die Umwandlung von KAPA zu Biotin unterbrochen war, konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Mit diesen Stämmen wurden Overlay-Reportertests durchgeführt (Abb. 3-17). Die Zellen wurden dazu mit dem Reporterplasmid

VHT1-lacZ transformiert und auf biotinfreien Minimalmedium-Platten ausplattiert. Biotin bzw. KAPA wurde auf Filterplättchen zugesetzt. Nach 36 h Inkubation bei 30 °C wurden die Platten mit Overlay-Lösung überschichtet und die Reporteraktivitäten nach weiteren 5 h Inkubation bei 37 °C dokumentiert. Beim WT-Stamm wiesen die Zellen nahe des biotingetränkten Filterplättchens (hohe Biotinkonzentration) kaum Reporteraktivität auf und erst bei niedrigen Biotinkonzentrationen war eine gesteigerte Expression des Reportergens durch Blaufärbung zu erkennen. Einen Ring mit etwas kleinerem Durchmesser zeigten WT-Zellen auch auf der Platte mit KAPA, *bio3Δ*- und *bio4Δ*-Deletionsmutanten aber nur auf den Platten mit Biotingradienten. Auf den Platten mit KAPA-getränkten Filterplättchen besaßen alle *bio3Δ*- und *bio4Δ*-Zellen hohe β -Galaktosidaseaktivitäten, das heißt KAPA konnte die Expression des Reportergens und damit auch die Biotinmangelantwort in den Mutanten nicht beeinflussen.

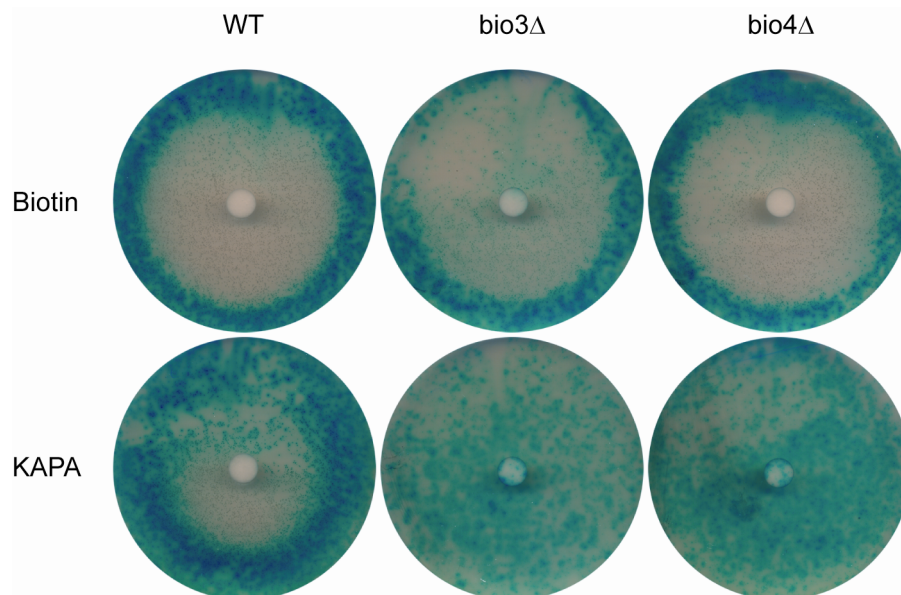


Abb. 3-17: KAPA kann bei *bio3Δ*- und *bio4Δ*-Mutanten die Expression eines biotinabhängig regulierten Reportergens nicht unterdrücken. Mit BY4742 (WT), *bio3Δ*- und *bio4Δ*-Mutanten, die als Reporterplasmide *VHT1-lacZ* trugen, wurden β -Galaktosidase-Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wurden die Zellen gleichmäßig auf biotinfreien Minimalmedium-Platten plattiert und auf deren Mitte ein mit Biotin beziehungsweise KAPA (wie angegeben) getränktes Filterplättchen eingebracht. Nach 36 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen mit Overlaylösung überschichtet und die sich anschließende Blaufärbung der Zellen nach 5 h dokumentiert.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, dass die beiden Biotinvorstufen KAPA und DTB in Bezug auf die Regulation der Biotingene biotinähnliche Aktivitäten besitzen, diese jedoch auf der Umwandlung der Vorstufen zu Biotin beruhen. Somit nehmen die Zellen intrazelluläres Biotin, nicht aber KAPA oder DTB wahr. Weil KAPA in *vht1Δ*-Mutanten reprimierend wirkt, kann auch ausgeschlossen werden, dass Vht1p für die Wahrnehmung von Biotin nötig ist.

3.2.3 Die Aktivität der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p beeinflusst die Biotinwahrnehmung

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, bestimmt die intrazelluläre Biotinkonzentration die Biotinmangelantwort. Die Frage ist nun, auf welcher Ebene die Konzentration des intrazellulären Biotins von der Zelle wahrgenommen wird. Hier könnte die Menge an freiem Biotin, der Biotinylierungsgrad der biotintragenden Proteine oder auch die Aktivität dieser Proteine der Signalgeber sein.

Durch die Verwendung von Mutanten, bei denen die Aktivität der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p reduziert war, konnten Hefezellen mit einem verminderten Grad an Proteinbiotinylierung untersucht werden. *BPL1* ist zwar ein essentielles Gen, aber in einer früheren Arbeit konnten lebensfähige *bpl1*-Mutanten isoliert werden, bei denen eine Restaktivität der Bpl1p vorhanden war [Mishina *et al.*, 1980]. Da diese Mutanten eine verringerte Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität und eine reduzierte Fettsäurebiosynthese und -elongation besaßen, mussten dem Medium zum Wachstum Fettsäuren zugesetzt werden [Mishina *et al.*, 1980]. Zur Beurteilung der biotinabhängigen Genregulation wurden β -Galaktosidasetests mit dem Stamm *bpl1*-3826 und *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid durchgeführt. Wie erwartet, reagierte der WT-Stamm in typischer Weise auf Biotinmangel durch eine Erhöhung der Reporteraktivität (Abb. 3-18). Die *bpl1*-Mutanten besaßen allerdings schon in Normal-Biotinmedium eine stark erhöhte β -Galaktosidaseaktivität, die sich durch einen Mangel an Biotin nicht mehr steigern ließ (Abb. 3-18).

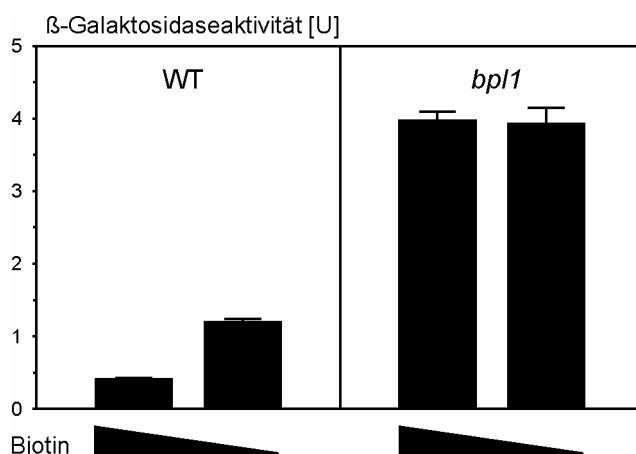


Abb. 3-18: Konstant erhöhte Reporteraktivität bei *bpl1*-Mutanten. Reportergentests wurden mit *VHT1-lacZ* tragenden W303-1A WT-Zellen (WT) bzw. *bpl1*-3826-Mutanten (*bpl1*) durchgeführt. Das Wachstum der Zellen erfolgte 24 – 40 h in Fettsäure-Medium mit 2 bzw. 0,2 μ g/l Biotin (wie angezeigt). In die Tests wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase ($A_{600} = 0,4 - 1,2$) eingesetzt.

Um die Rolle der Bpl1p bei der Biotinwahrnehmung zu bestätigen, wurden die Reportertests mit Mutanten wiederholt, bei denen sich die Expression des *BPL1*-Gens regulieren ließ. Dazu wurde von Jürgen Stolz in dem Genom eines WT-Stammes der *BPL1*-Promotor durch den galaktose-regulierbaren *GALI*-Promotor ersetzt. Für die β -Galaktosidasetests wurden die *GAL-BPL1*-Zellen

in Normal-Biotinmedium mit Glukose (*BPL1*-Expression wird reprimiert) bzw. Galaktose (*BPL1*-Expression wird induziert) als Kohlenstoffquelle angezogen. Während bei WT-Zellen die β -Galaktosidaseaktivität unter beiden Bedingungen etwa gleich war, fiel bei den *GAL-BPL1*-Zellen eine deutlich erhöhte *lacZ*-Expression nach dem Wachstum in Glukose-Medium, das heißt nach einer Verarmung an Bpl1p, auf (Abb. 3-19A). Zudem konnte diese hohe β -Galaktosidaseaktivität durch Biotinmangelmedium kaum weiter gesteigert werden (Abb. 3-19B), was mit der Situation bei den *bpl1-3826*-Mutanten übereinstimmt (Abb. 3-18).

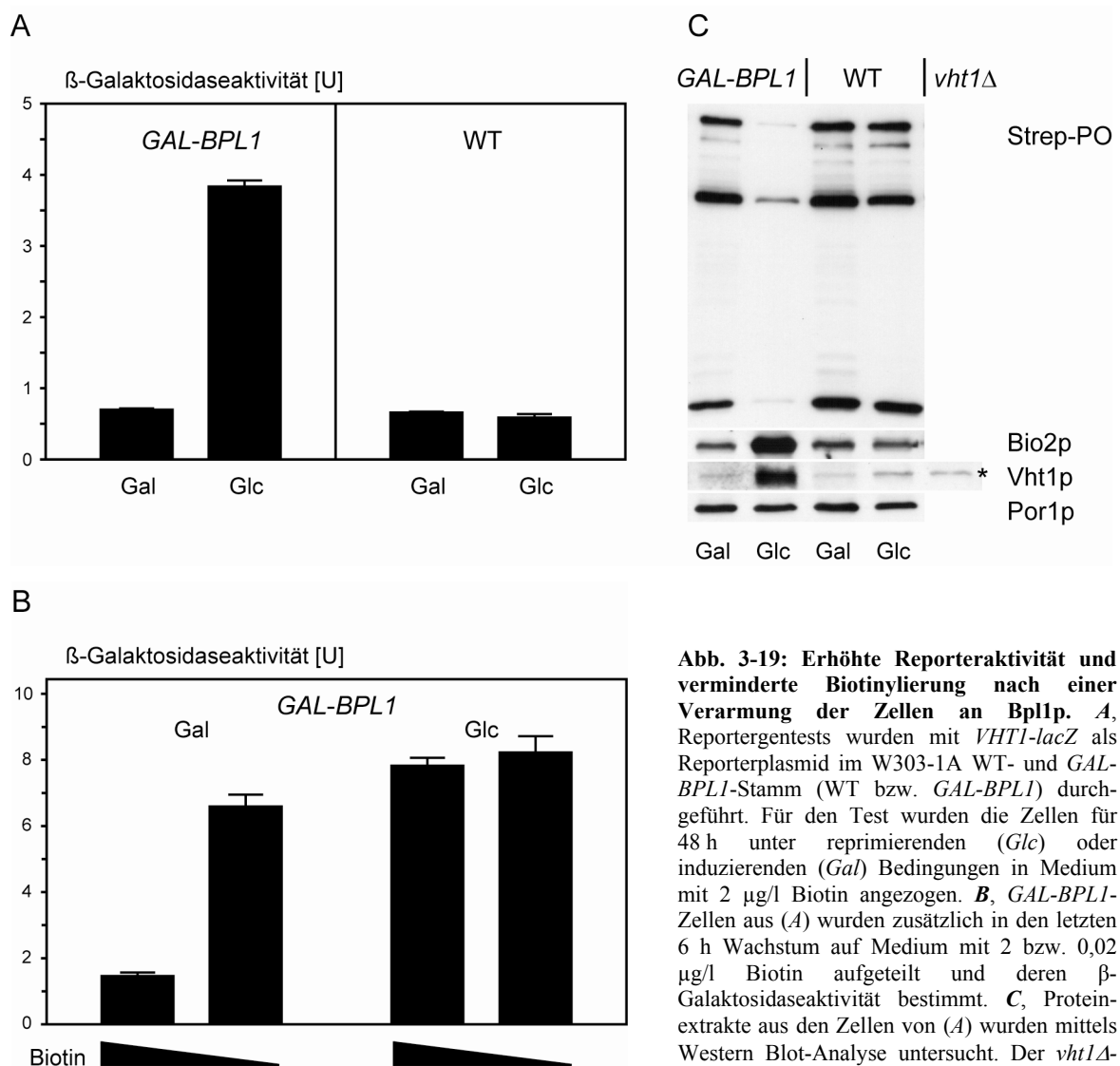


Abb. 3-19: Erhöhte Reporteraktivität und verminderte Biotinylierung nach einer Verarmung der Zellen an Bpl1p. **A**, Reportergentests wurden mit *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid im W303-1A WT- und *GAL-BPL1*-Stamm (WT bzw. *GAL-BPL1*) durchgeführt. Für den Test wurden die Zellen für 48 h unter reprimierenden (*Glc*) oder induzierenden (*Gal*) Bedingungen in Medium mit 2 μ g/l Biotin angezogen. **B**, *GAL-BPL1*-Zellen aus (**A**) wurden zusätzlich in den letzten 6 h Wachstum auf Medium mit 2 bzw. 0,02 μ g/l Biotin aufgeteilt und deren β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. **C**, Proteinextrakte aus den Zellen von (**A**) wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Der *vht1* Δ -Stamm wurde in Medium mit 200 μ g/l Biotin und Glukose angezogen. Die Blots wurden wie

angezeigt zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO oder Seren gegen Bio2p, Vht1p oder Por1p (Beladungskontrolle) dekoriert. Aufgrund seiner geringen Aktivität ergab das Vht1p-Serum nur bei einer Überexpression von *VHT1* Signale (vgl. *GAL-BPL1* in Glukose). Die mit einem Sternchen markierte schwache Bande zeigt ein Protein, welches mit dem Vht1p-Serum kreuzreagierte und ebenfalls in *vht1* Δ -Mutanten vorhanden war.

Wie schon bei den Tests mit *vht1Δ*-Mutanten (vgl. Kapitel 3.2.1; Seite 63) wurden diese β -Galaktosidasetestergebnisse mit *GAL1-BPL1*-Zellen, die pMEL β 2-Fragment D (vgl. Abb. 3-6) als Reporterplasmid trugen, bestätigt (Abb. 3-20).

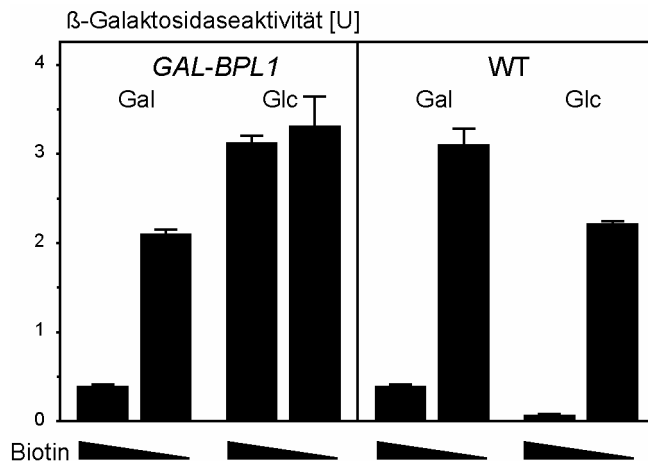


Abb. 3-20: Reportertests mit *GAL1-BPL1*-Zellen und pMEL β 2-Fragment D. Unter den gleichen Bedingungen wie bei Abb. 3-19A und B wurden Reportertests mit W303-1A WT- und *GAL-BPL1*-Stämmen durchgeführt (WT bzw. *GAL-BPL1*). Diesmal enthielten die Zellen jedoch pMEL β 2-Fragment D (Abb. 3-6) als Reporterplasmid.

Die Analyse der biotintragenden Proteine durch Western Blots (Abb. 3-19C) ergab eine Übereinstimmung des Biotinylierungsmusters bei *GAL-BPL1*-Zellen nach einem Wachstum in Galaktose und WT-Zellen unter beiden Bedingungen. Es war jedoch eine deutlich verringerte Proteinbiotinylierung von *GAL-BPL1*-Zellen in Glukose zu beobachten (Abb. 3-19C). Einhergehend mit den Defiziten bei der Biotinylierung war bei den *GAL-BPL1*-Zellen, bei denen die Expression von *BPL1* reprimiert war, sowohl die Expression von Bio2p als auch Vht1p induziert. Die Menge an Bio2p bei *GAL-BPL1*-Zellen in Galaktose war wieder ähnlich der in den WT-Zellen; Vht1p war wie auch im WT nicht zu detektieren (Abb. 3-19C). Diese Ergebnisse werden durch Northern Blot-Analysen von Sabine Laberer und Jürgen Stolz unterstützt, die eine erhöhte Expression von *BIO2* und *BIO5* in *bpl1-3826*-Mutanten zeigten.

Die Konzentration freien Biotins war in den *GAL-BPL1*-Zellen mit 0,91 ng Biotin/ μ l Zellvolumen (Glukose) bzw. 1,09 ng Biotin/ μ l Zellvolumen (Galaktose) in etwa gleich groß, gegenüber WT-Zellen (0,5 ng Biotin/ μ l Zellvolumen in Glukose bzw. 0,56 ng Biotin/ μ l Zellvolumen in Galaktose) jedoch um etwa das Doppelte erhöht (Tab. 3-4, Seite 79).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Voraussetzung für eine normale Biotinwahrnehmung eine normale Bpl1p-Aktivität ist. Zellen, bei denen die Aktivität der Biotin-Protein-Ligase verringert ist, induzieren eine Biotinmangelantwort, auch wenn sie eine normale bis leicht erhöhte Konzentration an freiem intrazellulären Biotin besitzen.

3.2.4 Die Rolle der biotintragenden Enzyme

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass die Biotin-Protein-Ligase Bpl1p eine wichtige Rolle in der Biotinwahrnehmung spielt, denn eine defekte Bpl1p führte trotz einer normalen intrazellulären Biotinkonzentration zu einer Biotinmangelantwort. Die Zielproteine der Bpl1p sind sowohl bei Biotinmangel als auch bei einer defekten Bpl1p unterbiotinyliert und besitzen damit auch eine geringere Aktivität. Aus diesem Grund musste als Nächstes geklärt werden, ob eines der biotintragenden Enzyme an der Biotinwahrnehmung beteiligt ist.

Dazu wurden Standardreportertests mit *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid und zum Teil auch ^{14}C -Biotin-Aufnahmetests (zur Bestimmung der Aktivität von Vht1p) mit Stämmen durchgeführt, denen jeweils ein biotintragendes Protein fehlte.

Um die Bedeutung des essentiellen Enzyms Acc1p für die Biotinmangelantwort zu klären, wurde das Gen, ähnlich wie bei *BPL1* (vgl. Kapitel 3.2.3), unter die Kontrolle des galaktose-regulierbaren *GAL1*-Promotors gestellt. Für den β -Galaktosidasetest wurden der von Jürgen Stolz hergestellte *GAL-ACC1*-Stamm zunächst in Normal-Biotinmedium mit Glukose (Repression der *ACC1*-Expression) bzw. Galaktose (Aktivierung der *ACC1*-Expression) als Kohlenstoffquelle angezogen und dann jeweils für 6 h in Normal- und Niedrig-Biotinmedium überführt (Abb. 3-21A; Tab. 3-3, Seite 78).

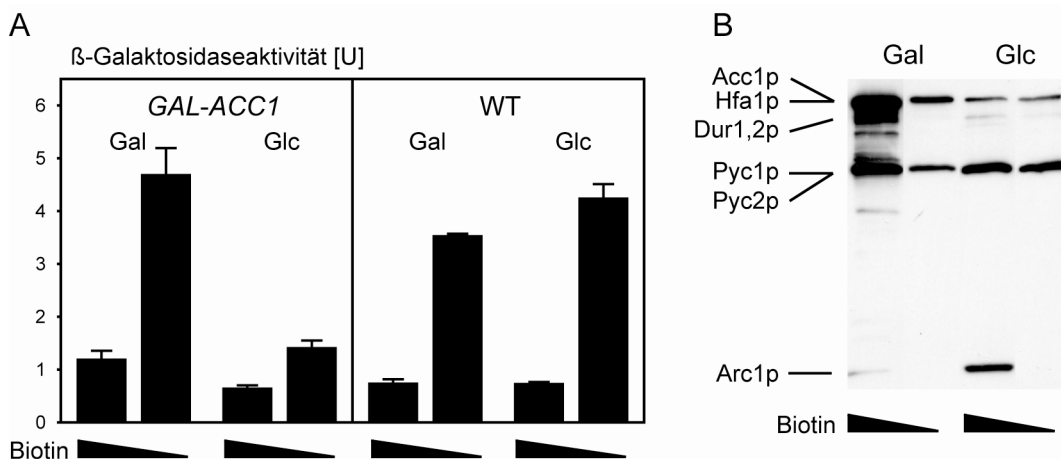


Abb. 3-21: Reportertests mit *GAL-ACC1*-Stamm. **A**, Reportertests wurden mit *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid im *GAL-ACC1*- bzw. W303-1A WT-Stamm (*GAL-ACC1* bzw. WT) durchgeführt. Für die Tests wurden die Zellen zunächst für 16 h unter reprimierenden (Glc) oder induzierenden (Gal) Bedingungen in Medium mit 2 $\mu\text{g/l}$ Biotin angezogen und dann für die letzten 6 h Wachstum jeweils auf Medium mit 2 bzw. 0,02 $\mu\text{g/l}$ Biotin aufgeteilt (wie angezeigt). Nach der Ernte wurde die β -Galaktosidaseaktivität in den Zellen bestimmt. **B**, Die geernteten Zellen aus (**A**) wurden zur Kontrolle der *ACC1*-Expression einer Western Blot-Analyse unterzogen. Der Blot wurde zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO dekoriert.

Im WT-Stamm war die *lacZ*-Expression bei Normal-Biotinbedingungen nach Anzucht in Galaktose- und Glukosemedium etwa gleich groß. Die Verarmung von *GAL-ACCI*-Zellen an Acc1p (Anzucht in Glukosemedium) führte jedoch zu einer deutlichen Abnahme der β -Galaktosidaseaktivität auf etwa die Hälfte der Aktivität nach Anzucht der Zellen in Galaktosemedium (Abb. 3-21A; Tab. 3-3, Seite 78). Bei Niedrig-Biotinbedingungen war eine Abnahme der Reporteraktivität bei verringerter *ACCI*-Expression um etwa ein Drittel zu beobachten. Die Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität durch Biotinmangel war bei den WT-Zellen 4,8x (Gal) bzw. 5,8x (Glc). Bei dem *GAL-ACCI*-Stamm war nach dem Wachstum in Galaktose eine Induktion von 3,9x und unter reprimierenden Bedingungen von nur noch 2,2x zu messen (Abb. 3-21A; Tab. 3-3, Seite 78).

Zur Kontrolle der *ACCI*-Expression wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Zur Detektion der biotintragenden Proteine wurde der Blot mit Strep-PO dekoriert. Wie erwartet, führte das Wachstum der *GAL-ACCI*-Zellen unter Normal-Biotinbedingungen im Galaktosemedium zu einer stärkeren Bande von Biotinyl-Acc1p/Biotinyl-Hfa1p als im Glukosemedium (Abb. 3-21B). Bei Niedrig-Biotinbedingungen war die Biotinylierung der biotintragenden Proteine sowohl bei Galaktose- als auch bei Glukosebedingungen reduziert. Auffällig war die deutlich verminderte Biotinyl-Arc1p-Bande bei Normal-Biotin im Galaktosemedium im Vergleich zu Glukosemedium. Vermutlich hat Apo-Arc1p unter den biotintragenden Proteinen die schwächste Affinität zur Bp1lp und den Zellen steht bei einer hohen Expression von Apo-Acc1p nicht ausreichend Biotin zur Verfügung, um alle Apo-Biotinproteine zu biotinylieren.

Interessant in diesem Zusammenhang war auch, dass WT-Zellen eine reduzierte Reporterexpression zeigten, wenn ihnen zum Wachstum Fettsäuren zugesetzt wurden (Abb. 3-22). Dies war sowohl bei *VHT1-lacZ* (Abb. 3-22A) als auch bei *BIO2-lacZ* (Abb. 3-22B) und pMEL β 2-Fragment A (Abb. 3-22C) als Reporterplasmid der Fall. Der Zusatz von langkettigen Fettsäuren ins Nährmedium reduziert in *S. cerevisiae* die Aktivität der Acc1p durch eine Verringerung der *ACCI*-mRNA und der zellulären Enzymmenge [Kamiryo *et al.*, 1976; Chirala, 1992].

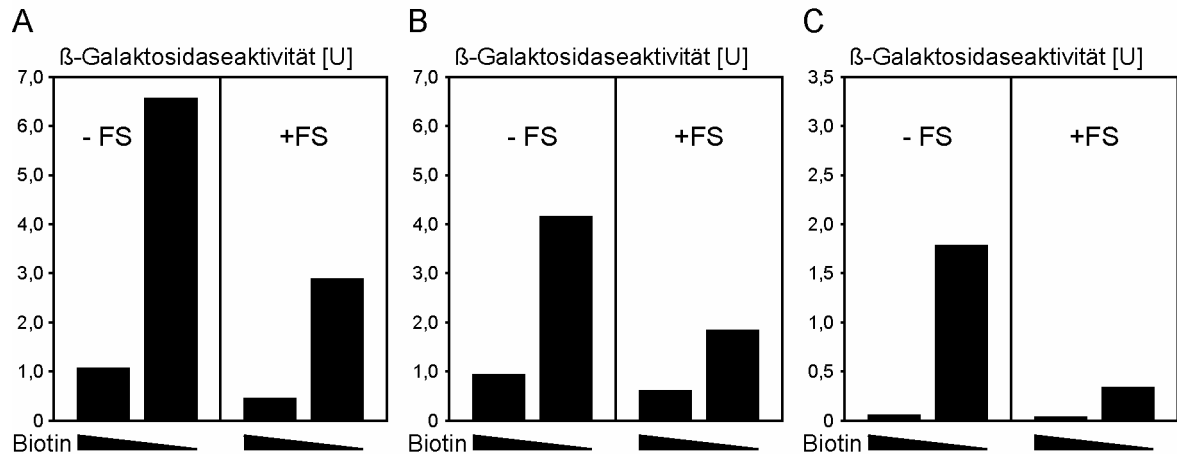


Abb. 3-22: Reportertests nach Zusatz von Fettsäuren. W303-1A WT-Zellen mit verschiedenen Reporterplasmiden wurden in Normal- bzw. Niedrig-Biotinmedium jeweils mit (+FS) bzw. ohne (-FS) Fettsäurezusatz (300 mg/l Butterhydrolysat und 1 % (v/v) Tween 40) für β -Galaktosidasetests angezogen (wie angegeben). Es erfolgte jeweils nur eine Einfachbestimmung der Werte. **A**, Zellen mit *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid wurden zunächst in Medium mit 2 µg/l Biotin bzw. 0,2 µg/l Biotin kultiviert und aus der ÜN-Kultur jeweils auf eine OD_{600} von 0,2 in neues Medium mit bzw. ohne Fettsäuren überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 7,5 h wurden die Zellen bei einer $OD_{600} = 1,0 - 1,3$ geerntet und in dem Test eingesetzt. **B**, Zellen mit *BIO2-lacZ* als Reporterplasmid wurden in Medium mit 2 µg/l Biotin mit bzw. ohne Fettsäurezusatz angezogen und aus der ÜN-Kultur in neues Medium mit 2 µg/l bzw. 0,2 µg/l Biotin überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 6,5 h wurden die Zellen in den Test eingesetzt. **C**, Zellen mit *pMELβ2-Fragment A* als Reporterplasmid wurden in Medium mit 2 µg/l bzw. 0,2 µg/l Biotin mit bzw. ohne Fettsäurezusatz angezogen und aus der ÜN-Kultur in neues Medium überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 6,5 h wurden die Zellen in den Test eingesetzt.

Zur Kontrolle von *Hfa1p*, *Dur1,2p*, *Arc1p*, *Pyc1p* und *Pyc2p* konnten Deletionsstämme mit *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid verwendet werden (Abb. 3-23; Abb. 3-24; Tab. 3-3, Seite 78). Wie bei *Acc1p* wurde auch hier deutlich, dass die Zellen durch Fehlen von *Hfa1p*, *Dur1,2p* und *Arc1p* nur noch eine verringerte Fähigkeit besaßen, das Reportergen in Niedrig-Biotin zu exprimieren (Abb. 3-23A). Die Aktivierungsrate fiel hierbei von 6,7x (WT) auf 4,5x (*hfa1Δ*), 2,6x (*dur1,2Δ*) bzw. 1,8x (*arc1Δ*) zurück (Abb. 3-23A; Tab. 3-3). Zur weiteren Kontrolle wurde mit den *arc1Δ*-Zellen ein Biotinaufnahmetest mit einem ähnlichen, wenn auch nicht ganz so drastischem Resultat (Induktion von 5,5x bei *arc1Δ*-Zellen statt 9,3x bei WT-Zellen) durchgeführt (Abb. 3-23B). Dabei wurden die Zellen wie für einen β -Galaktosidasetest über Nacht in Normal-Biotinmedium angezogen und dann für 6 h auf Normal- und Niedrig-Biotinmedium (Niedrig-Biotinmedium hier 0,2 µg/l Biotin) aufgeteilt. Die Aufnahmegeschwindigkeiten ^{14}C -markierten Biotins sind ein direktes Maß für die Aktivitäten des Biotintransporters *Vht1p* und betrugen beim WT-Stamm 0,26 bzw. 2,43 pmol Biotin·OD Zellen $^{-1}$ ·s $^{-1}$ (Normal- bzw. Niedrig-Biotinbedingungen). Beim *arc1Δ*-Stamm waren die Aufnahmegeschwindigkeiten nach Anzucht in Normal- bzw. Niedrig-Biotinmedium auf 0,24 bzw. 1,31 pmol Biotin·OD Zellen $^{-1}$ ·s $^{-1}$ reduziert.

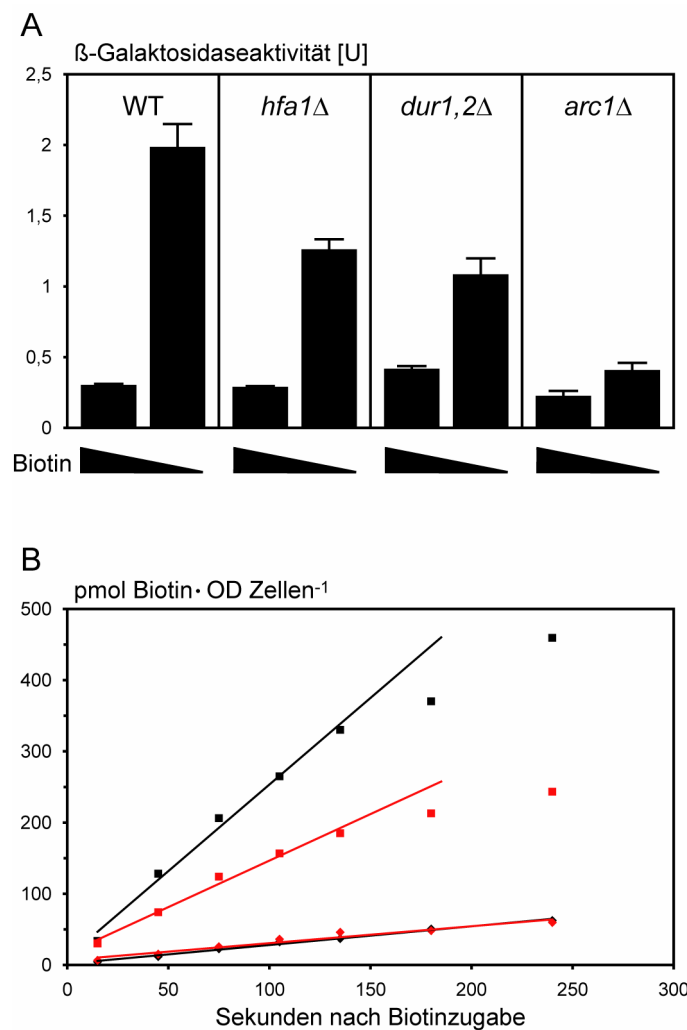


Abb. 3-23: Untersuchung der Stämme *dur1,2* Δ , *hfa1* Δ und *arc1* Δ . **A**, Mit BY4742 WT-Zellen und isogenen Deletionsmutanten, denen die biotintragenden Proteine Hfa1p, Dur1,2p bzw. Arc1p fehlten, wurden β -Galaktosidasetests mit *VHT1-lacZ* als Reporterkonstrukt durchgeführt. Vor dem Test wurden die Stämme zunächst in 2 μ g/l Biotin angezogen und dann für 6 h auf Medium mit 2 bzw. 0,02 μ g/l Biotin aufgeteilt. **B**, Mit WT- und *arc1* Δ -Zellen wurden ¹⁴C-Biotin-Aufnahmetests durchgeführt. Diesmal wurden die Zellen für 6 h in 2 μ g/l Biotin (\blacklozenge WT und \redlozenge *arc1* Δ) bzw. 0,2 μ g/l Biotin (\blacksquare WT und \redsquare *arc1* Δ) aufgeteilt.

Da die Doppelmutanten *pyc1 pyc2* Δ (Deletion von *PYC1* durch Integration von *LEU2* und Deletion von *PYC2* im Austausch gegen eine *kanMX4*-Kassette) und *pyc1 pyc2* (Deletion von *PYC1* durch Integration *LEU2* und Deletion von *PYC2* durch Integration von *URA3*) nur nach Zusatz von Aspartat wuchsen, wurde dem Medium zum Test der Pyc-Mutanten 40 mM Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0, (zur Stabilisierung des pH-Wertes) zugefügt. Der WT-Stamm hatte nach 6 h Biotinmangel eine 3,3x gesteigerte *lacZ*-Expression, die durch das Fehlen von Pyc1p (3,8x Induktion) nicht wesentlich beeinflusst wurde (Abb. 3-24; Tab. 3-3, Seite 78). Allerdings zeigten *pyc2* Δ -Zellen nur noch eine 1,5x Induktion und die *pyc1 pyc2* Δ -Doppelmutante einen kompletten Verlust der Biotinmangelantwort (Abb. 3-24; Tab. 3-3, Seite 78).

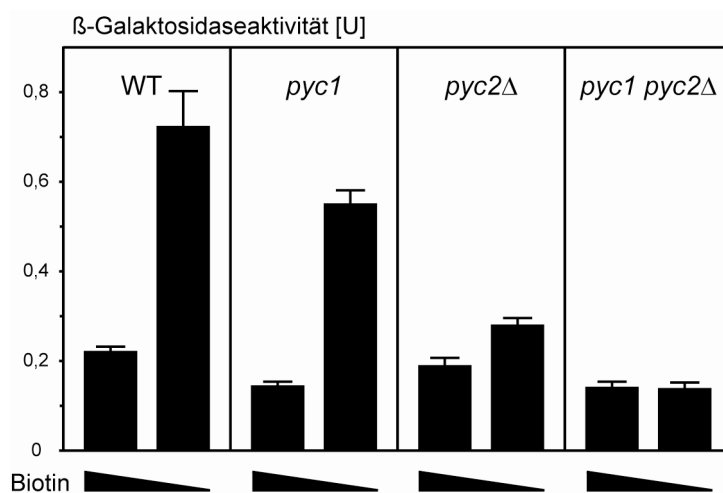


Abb. 3-24: Reportertests mit *pyc1*-, *pyc2Δ*-, und *pyc1 pyc2Δ*-Stämmen. β -Galaktosidasetests wurden mit W303-1A WT-Zellen und *pyc1*-, *pyc2Δ*- bzw. *pyc1 pyc2Δ*-Mutanten durchgeführt. Die Zellen trugen *VHT1-lacZ* als Reporterplasmid und wurden für den Test über Nacht in 2 µg/l Biotin und 6 h in 2 bzw. 0,02 µg/l Biotin inkubiert. Das Medium enthielt jeweils zusätzlich 40 mM Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0.

Diese Effekte wurden durch Biotinaufnahmetests bestätigt (Tab. 3-2), jedoch mit der Ausnahme, dass hier auch *pyc1* eine reduzierte Biotinmangelantwort aufwies. Bei BY4742-Stämmen war diese Ausnahme jedoch nicht zu beobachten.

Hefestamm	Aufnahmerate [pmol Biotin · OD ₆₀₀ Zellen ⁻¹ · s ⁻¹]		Aktivierung
	2 µg/l Biotin	0,2 µg/l Biotin	
W303-1A (WT)	0,38	1,84	4,8x
<i>pyc1</i>	0,36	0,69	1,9x
<i>pyc2</i>	0,39	0,51	1,3x
<i>pyc1 pyc2</i>	0,28	0,32	1,1x
BY4742	0,10	0,32	3,2x
BY4741 <i>pyc1Δ</i>	0,10	0,32	3,2x
BY4742 <i>pyc2Δ</i>	0,11	0,13	1,2x

Tab. 3-2: Aufnahmetests mit *pyc1*-, *pyc2*-, und *pyc1 pyc2*-Stämmen. Zur Messung der Aufnahmerate von ¹⁴C-Biotin wurden W303-1A WT-, *pyc1*-, *pyc2*- und *pyc1 pyc2*-Stämme und BY4742 WT-, BY4741 *pyc1Δ*- und BY4742 *pyc2Δ*-Stämme aus Normal-Biotinmedium (2 µg/l) in Normal- und Niedrig-Biotinmedium (0,2 µg/l) überimpft und nach 6 h Wachstum geerntet. Das Medium enthielt jeweils zusätzlich 40 mM Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0. Aufgeführt sind neben den Aufnahmeraten in pmol Biotin pro OD₆₀₀ Zellen pro Sekunde die jeweiligen Aktivierungsraten. Diese berechnen sich aus dem Quotienten der Aufnahmeraten aus Niedrig-Biotinzellen zu Normal-Biotinzellen.

Fasst man die Experimente zu den biotintragenden Enzymen zusammen, zeigt sich, dass in jedem Fall das Entfernen eines biotintragenden Proteins eine schwächere Biotinmangelantwort nach sich zog. Den größten Effekt erzeugte die Doppelmutante *pyc1 pyc2Δ*, gefolgt von den *pyc2Δ*- und *arc1Δ*-Mutanten. Aber auch der Verlust der mitochondrialen Acetyl-CoA-Carboxylase Hfa1p und

des unter Normalbedingungen nur gering exprimierten Dur1,2p-Proteins verringerte die Expression des Reportergens bei Biotinmangel (Tab. 3-3).

Hefestamm	β -Galaktosidaseaktivität [U]		Aktivierung
	2 μ g/l Biotin	0,02 μ g/l Biotin	
BY4742 (WT)	0,295 \pm 0,016	1,978 \pm 0,171	6,7x
<i>arc1</i> Δ	0,218 \pm 0,043	0,400 \pm 0,059	1,8x
<i>dur1,2</i> Δ	0,410 \pm 0,027	1,077 \pm 0,122	2,6x
<i>hfa1</i> Δ	0,281 \pm 0,014	1,254 \pm 0,080	4,5x
W303-1A (WT) ^a	0,734 \pm 0,083	3,525 \pm 0,048	4,8x
W303-1A (WT) ^b	0,727 \pm 0,040	4,237 \pm 0,275	5,8x
<i>GAL-ACCI</i> ^a	1,187 \pm 0,169	4,681 \pm 0,511	3,9x
<i>GAL-ACCI</i> ^c	0,640 \pm 0,063	1,407 \pm 1,444	2,2x
W303-1A (WT) ^d	0,733 \pm 0,041	2,407 \pm 0,268	3,3x
<i>pyc1</i> ^d	0,478 \pm 0,037	1,830 \pm 0,107	3,8x
<i>pyc2</i> Δ ^d	0,628 \pm 0,065	0,931 \pm 0,055	1,5x
<i>pyc1 pyc2</i> Δ ^d	0,466 \pm 0,045	0,457 \pm 0,049	1,0x

^a Anzucht in Medium mit 2 % Galaktose.

^b Anzucht in Medium mit 2 % Glukose.

^c Anzucht für 22 h in Medium mit 2 % Glukose.

^d Anzucht in Medium mit 2 % Glukose, 40 mM L-Aspartat, 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0.

Tab. 3-3: Reportergenaktivitäten und Aktivierungsraten verschiedener Mutanten und WT-Stämme. Die Tabelle fasst die Reportergenaktivitäten von WT-Stämmen und Mutanten, bei denen biotintragende Proteine fehlten bzw. unter der Kontrolle eines galaktose-induzierbaren Promoters standen, aus den Abb. 3-21A, 3-23A und 3-24 zusammen. Das Reporterplasmid war jeweils *VHT1-lacZ*, die Anzucht der Zellen erfolgte wie oben bzw. bei den Abbildungen angegeben. Der Aktivierungsfaktor gibt die Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität aus Niedrig-Biotinzellen zu Normal-Biotinzellen an.

Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass das Fehlen eines biotintragenden Proteins eine Steigerung der Konzentration an intrazellulärem freien Biotin bedingt. Biotinproteinmutanten besaßen somit einen größeren Biotinvorrat und Wachstum in Niedrig-Biotinmedium würde zu einem verspäteten Biotinmangel und der entsprechenden Biotinmangelantwort in den Zellen führen. Die Messung der Konzentration intrazellulären freien Biotins von *arc1* Δ -Mutanten konnte diese Hypothese unterstützen. Die Mutanten besaßen nämlich bei Anzucht in Normal-Biotinmedium eine doppelt so hohe Konzentration freien Biotins wie WT-Zellen (Tab. 3-4).

In der folgenden Tabelle sind alle bislang erwähnten intrazellulären Biotinkonzentrationen zusammengefasst (Tab. 3-4).

Hefestamm	Intrazelluläre Konzentration freien Biotins [ng/μl]		
	Extrazelluläre Biotinkonzentration		
	Hoch	Normal	Niedrig
W303-1A ^a	12,8 ± 3,4	0,50 ± 0,08	0,053 ± 0,004
W303-1A ^b	ND ^c	0,56 ± 0,16	ND
<i>wht1Δ</i> ^a	0,053 ± 0,010	ND	ND
<i>GAL-BPL1</i> ^a	ND	0,91 ± 0,18	ND
<i>GAL-BPL1</i> ^b	ND	1,09 ± 0,21	ND
BY4742 ^a	ND	0,55 ± 0,22	0,03 ± 0,008
<i>arc1Δ</i> ^a	ND	1,12 ± 0,17	0,029 ± 0,009

^a Anzucht in Medium mit 2 % Glukose

^b Anzucht in Medium mit 2 % Galaktose

^c ND: nicht bestimmt

Tab. 3-4: Intrazelluläre Konzentrationen freien Biotins verschiedener Hefestämme. Die Hefestämme wurden in Medium (wie angegeben) mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen (Hoch: 20 μg/l Biotin bei W303-1A, 200 μg/l Biotin bei W303-1A *wht1Δ*; Normal: 2 μg/l Biotin; Niedrig: 0,02 μg/l Biotin) angezogen. Der Test zur Bestimmung der intrazellulären freien Biotinkonzentration wurde wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

Sollte die Hypothese Bestand haben, müsste demnach eine längere Verarmung der Mutantenstämme an Biotin zu einer normalen Biotinmangelantwort führen. Aus diesem Grund wurden die Reportertests von zwei stark betroffenen Stämmen, dem *arc1Δ*-Stamm und dem *pyc1 pyc2Δ*-Stamm, mit einer längeren Inkubation der Zellen in Niedrig-Biotinmedium wiederholt (Abb. 3-25).

Hier zeigte sich dann auch, dass *arc1Δ*-Zellen nach 18 h in Niedrig-Biotinmedium eine Steigerung der Reporterogenaktivität von immerhin 5,7x erreichen konnten (Abb. 3-25A). Dies entsprach fast dem Wert von WT-Zellen nach 6 h Biotinmangel (6,7x; Tab. 3-3). Eine andere Situation ergab sich bei der *pyc1 pyc2Δ*-Doppelmutante. Hier war auch nach 17 h Anzucht unter Biotinmangel nur eine geringfügige Erhöhung der *lacZ*-Expression sichtbar (Abb. 3-25B).

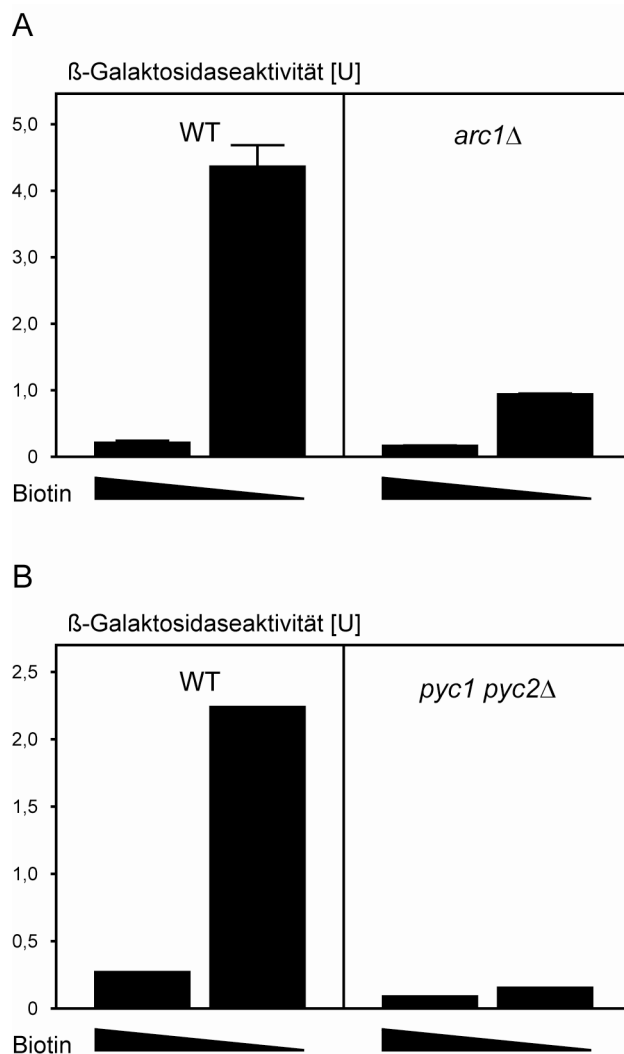


Abb. 3-25: Reporterogenaktivitäten von *arc1Δ*- und *pyc1 pyc2Δ*-Stämmen nach längerem Biotinmangel. *A*, Die Reporterogenaktivitäten von *VHT1-lacZ* wurden in BY4742 WT- und *arc1Δ*-Stämmen nach 18 h Inkubation in Normal- und Niedrig-Biotinmedium (2 bzw. 0,02 µg/l Biotin) bestimmt. *B*, Hier wurde der gleiche Test wie bei (*A*) mit W303-1A WT- und *pyc1 pyc2Δ*-Stämmen nach 17 h Wachstum durchgeführt (Einfachbestimmung). Zur Anzucht wurden dem Medium 40 mM Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0, zugesetzt.

Obwohl somit alle biotintragenden Proteine die Wahrnehmung von Biotinmangel in den Zellen beeinflussen, scheint den meisten nur eine indirekte Rolle zuzukommen. Das Vorhandensein zumindest einer Pyruvatcarboxylase, insbesondere von Pyc2p, könnte dagegen essentiell für die Biotinmangelantwort sein.

3.2.5 Aktive Pyruvatcarboxylasen sind eine Voraussetzung für die Biotinmangelantwort

In dem vorangegangenen Kapitel gab es erste Hinweise, dass die Pyruvatcarboxylasen, besonders Pyc2p, zur Wahrnehmung von Biotinmangel wichtig sind. Dies sollte durch einen Reportertest mit einem Stamm, bei dem neben den Pyc-Genen auch das Gen für den Biotintransporter, *VHT1*,

deletiert war, überprüft werden. Wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben, führt die Deletion von *VHT1* zu einer Erniedrigung der intrazellulären Konzentration freien Biotins und einer stark erhöhten Reporterogenaktivität im Vergleich zum WT (Abb. 3-12; Abb. 3-26). Die Einführung der *vht1Δ*-Deletion in einen *pyc1 pyc2Δ*-Doppelmutationsstamm ergab jedoch keinerlei Steigerung der Reporterexpression (Abb. 3-26), womit eindeutig gezeigt ist, dass ohne die Pyruvatcarboxylasen keine Biotinmangelantwort möglich ist.

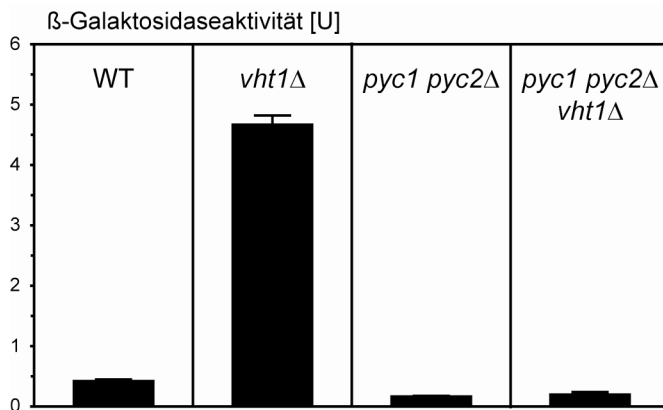


Abb. 3-26: Reportertest mit *pyc1 pyc2Δ vht1Δ*. In Medium mit 40 mM Aspartat, 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0, und 200 µg/l Biotin wurden die Stämme W303-1A (WT), *vht1Δ*, *pyc1 pyc2Δ* und *pyc1 pyc2Δ vht1Δ* bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 - 1,2 angezogen und β-Galaktosidasetests unterworfen. Als Reporterplasmid trugen sie jeweils *VHT1-lacZ*.

Damit ergab sich die Frage, in welcher Form die Pyruvatcarboxylasen die Biotinwahrnehmung beeinflussen. Eine Möglichkeit ist, dass der Biotinylierungsgrad der Pyc-Proteine ein Maß für die Verfügbarkeit von Biotin in der Zelle darstellt. Da die beiden Pyc-Proteine fast identische Molekulargewichte besitzen (Pyc1p 130,1 kD und Pyc2p 130,2 kD), liefen sie im SDS-Gel mit identischer Mobilität (Abb. 3-11; Abb. 3-27). Untersuchte man mittels Western Blot-Analyse aber Stämme mit genomisch markierten 3HA- bzw. 9Myc-Pyruvatcarboxylase-Versionen, trennten sich die Pyc1p- und die Pyc2p-Bande und sowohl die relative Menge als auch die Biotinylierung der einzelnen Pyc-Proteine konnte sichtbar gemacht werden. Wie auch schon durch die DNA-Array-Daten belegt (Abb. 3-8), änderte sich die Expressionstärke der Pyc-Proteine durch Biotinmangel kaum, sie war sogar im Fall von Pyc1-3HA bei Niedrig-Biotinbedingungen leicht erhöht (Abb. 3-8, Abb. 3-11, Abb. 3-27). Bei einem mit Strep-PO dekorierten Western Blot waren die Banden der biotinylierten Pyc-Proteine und somit letztlich auch der Biotinylierungsgrad beider Proteine bei Biotinmangel reduziert, wobei die im Vergleich zu Biotinyl-Pyc1p schwächere Bande von Biotinyl-Pyc2p bei Niedrig-Biotinbedingungen sogar (fast) ganz ausblieb (Abb. 3-27). Dies könnte wiederum im Zusammenhang mit der weitaus wichtigeren Rolle von Pyc2p in der Biotinwahrnehmung stehen.

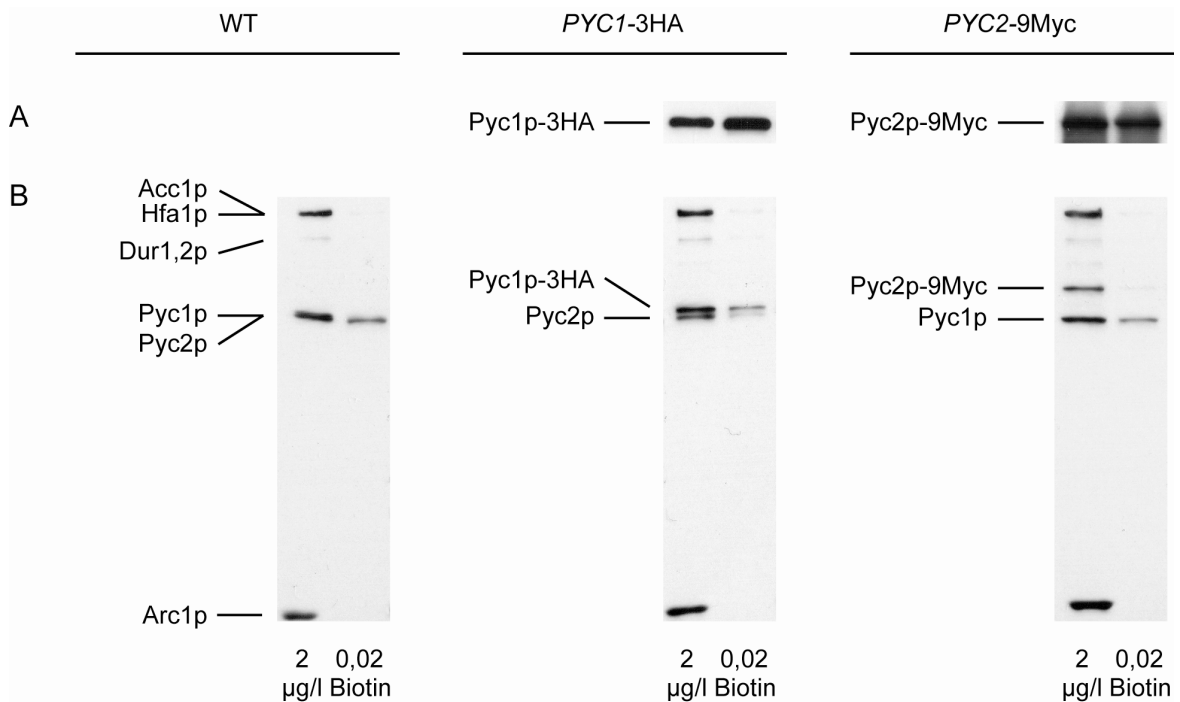


Abb. 3-27: Biotinylierungsgrad der Pyruvatcarboxylasen. Aus W303-1A Wildtyp-Zellen (WT), *PYC1*-3HA- und *PYC2*-9Myc-Stämmen wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Zellen wurden dazu vorher in 2 µg/l Biotin angezogen und wie angezeigt für 6 h in 2 bzw. 0,02 µg/l Biotin aufgeteilt. Zur Detektion von Pyc1p-3HA und Pyc2p-9Myc wurden die Blots mit anti-3HA- bzw. anti-9Myc-Seren (A) und zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO (B) dekoriert.

Um dem möglichen Einfluss der Pyc-Biotinylierung auf die Biotinmangelantwort weiter nachzugehen, wurden Pyc-Mutanten erzeugt, die unbiotinylierbare Apoproteine exprimierten. Die biotintragenden Lysine Lys¹¹³⁵ (Pyc1p; Basentriplett: ³⁴⁰³AAA³⁴⁰⁵) und Lys¹¹³⁶ (Pyc2p; Basentriplett: ³⁴⁰⁶AAA³⁴⁰⁸) waren bei beiden Pyc-Proteinen bekannt [Val *et al.*, 1995] und wurden mit Hilfe von homologer Rekombination von PCR-Produkten gegen Arginine (Triplett: AGA) ausgetauscht (vgl. Kapitel 2.2.2.14). Gleichzeitig wurden 3HA- bzw. 9Myc-Tags (mit *his5*- bzw. *kanMX*-Selektionsmarker) zur Detektion der Apoproteine im Western Blot eingeführt.

Da die Pyc^{K→R} Mutationen im Stammhintergrund von *pyc1* bzw. *pyc2* erzeugt wurden und somit einen kompletten Verlust der Pyc-Enzymaktivität bedeuteten, konnten die richtigen Klone über ihren Wachstumsphänotyp identifiziert werden. In Abb. 3-28A ist dies am Beispiel von *pyc1::LEU2 pyc2^{K/R}-9Myc(kanMX)* demonstriert. Die Mutante konnte wie der Doppelmutationsstamm nur auf Minimalmedium-Platten mit zugesetztem Aspartat wachsen, nicht jedoch auf normalen Minimalmedium-Platten. Das Wachstum von *pyc1::LEU2* und *pyc1::LEU2 PYC2*-9Myc war im Gegensatz dazu nicht beeinträchtigt (Abb. 3-28A). Gleichzeitig ist damit auch bewiesen, dass die Markierung am C-Terminus von Pyc2p die Proteinaktivität nicht stört.

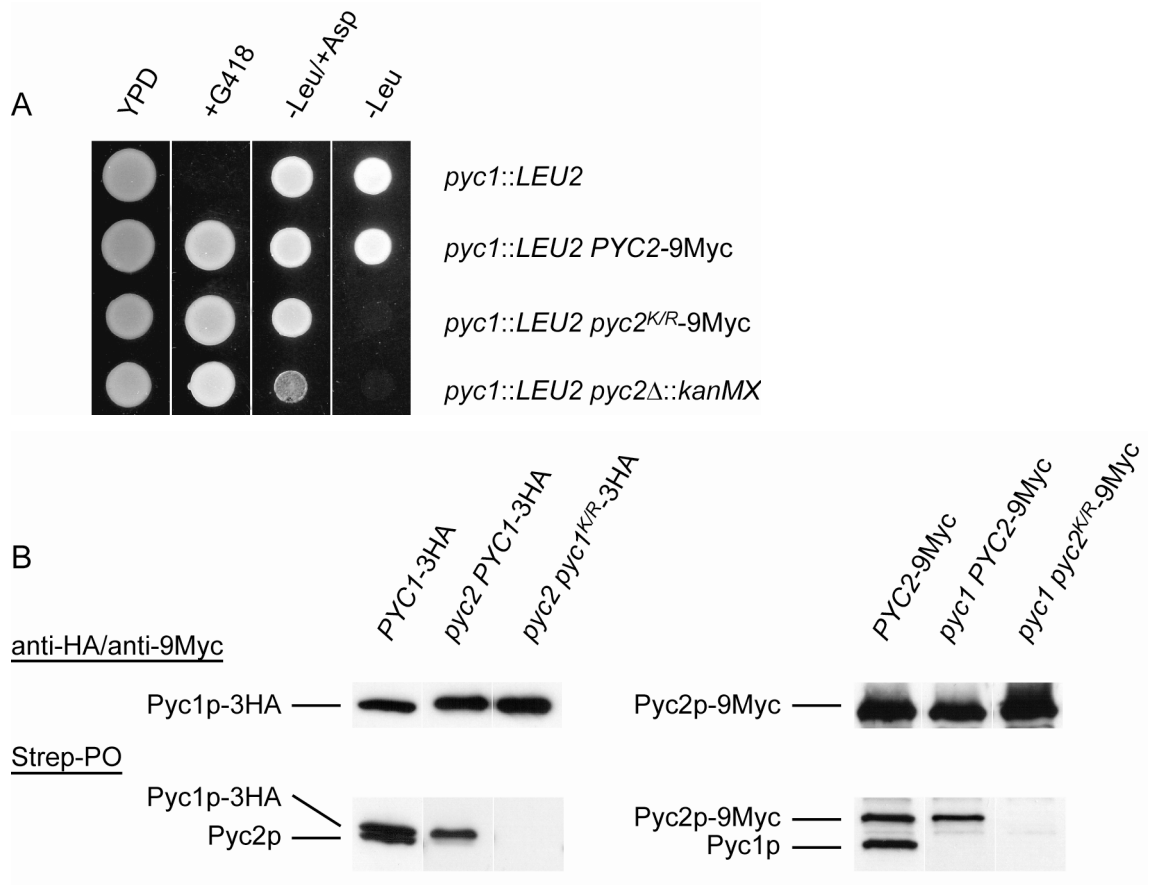


Abb. 3-28: Wachstumstest und Western Blot-Analyse zur Überprüfung der $Pyc^{K \rightarrow R}$ Mutationen. **A**, Zur Überprüfung des Wachstumsphänotyps wurde mit den Stämmen *pyc1::LEU2*; *pyc1::LEU2 PYC2-9Myc*; *pyc1::LEU2 pyc2^{K/R}-9Myc* und *pyc1::LEU2 pyc2Δ::kanMX* ein Wachstumstest (vgl. Kapitel 2.2.1.4) durchgeführt. Die Stämme wurden dazu in Wasser resuspendiert und ohne Einstellung der OD_{600} oder weiteren Verdünnungen auf YPD-, YPD+G418-, MMA-Leu- und MMA-Leu/+Asp-Platten ausgebracht. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. **B**, Für die Western Blot-Analyse wurden die Stämme *PYC1-3HA*, *pyc2::URA3 PYC1-3HA*, *pyc2::URA3 pyc1^{K/R}-3HA*, *PYC2-9Myc*; *pyc1::LEU2 PYC2-9Myc* und *pyc1::LEU2 pyc2^{K/R}-9Myc* in YPD angezogen und jeweils etwa 5 OD zur Gewinnung des Gesamtzellextraktes geerntet. Die Blots wurden zur Detektion der 3HA- bzw. 9Myc-markierten Proteine mit anti-3HA- bzw. anti-9Myc-Seren und zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO dekoriert (wie angezeigt).

Eine weitere Charakterisierung der *pyc1^{K/R}-3HA*- und *pyc2^{K/R}-9Myc*-Klone erfolgte über Western Blot-Analyse. Mit Hilfe der C-terminalen Markierungen konnte die Expression beider Apoproteine bestätigt werden. Das Fehlen der posttranslationalen Biotinylierung im Vergleich zu den genomisch markierten unmutierten Formen wurde mittels Dekoration des Western Blots mit Strep-PO demonstriert (Abb. 3-28B).

Mit den bestätigten *pyc^{K/R}*-Klonen wurden nun Reportertests mit *VHT1-lacZ* bzw. *YCplac22-VHT1-lacZ* (bei den *URA3⁺*-Stämmen) als Reporterplasmid durchgeführt (Abb. 3-29).

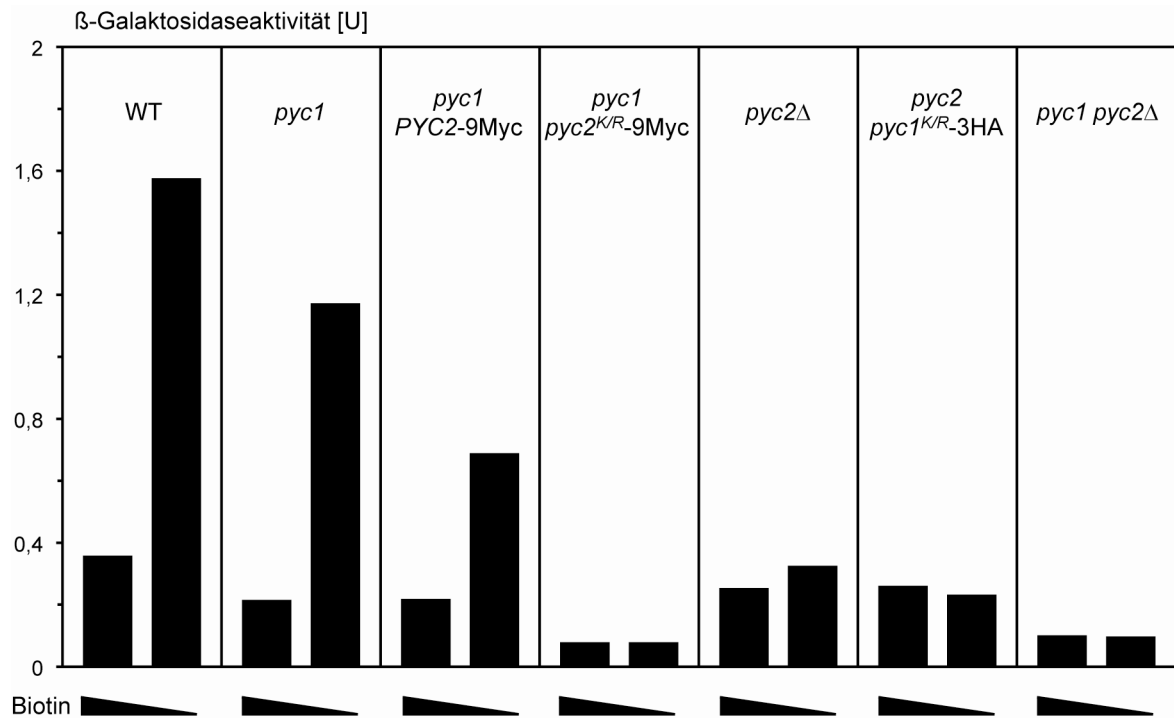


Abb. 3-29: Reportertests mit *pyc*^{K/R} Mutanten. Mit W303-1A WT-Zellen und verschiedenen Pyc-Mutanten (wie angezeigt), die *VHT1-lacZ* bzw. *YCplac22-VHT1-lacZ* als Reporterplasmid trugen, wurden β -Galaktosidasetests durchgeführt (hier jeweils nur Einfachbestimmung). Die Stämme wurden dazu in Medium mit 2 μ g/l Biotin und dann für 6 h in Medium mit 2 bzw. 0,02 μ g/l Biotin (wie angezeigt) angezogen. Außerdem wurde dem Medium 40 mM Aspartat und 15 mM Kaliumhydrogenphthalat, pH 5,0, zugesetzt.

Die Deletion von *PYC1* führte zu keinerlei Verlust der Biotinmangelantwort, sondern eher zu einer Steigerung derselben (5,5x) im Vergleich zum WT (4,4x) (Abb. 3-29; vgl. auch Abb. 3-24). Durch die Markierung am C-Terminus von Pyc2p schien die Biotinmangel-bedingte Expressionssteigerung von *lacZ* gehemmt (2,5x), war aber durchaus noch signifikant vorhanden. Dagegen wurde durch den Lys→Arg-Austausch in Pyc2p die Wahrnehmung von Biotinmangel komplett zerstört und der *pyc1 pyc2*^{K/R}-9Myc Stamm verhielt sich damit wie der Doppelmutationsstamm *pyc1 pyc2*Δ. Auch nach der Mutation des biotintragenden Lysins in Pyc1p im *pyc2*-Hintergrund war derselbe Effekt zu beobachten (Abb. 3-29). Allerdings muss man beachten, dass allein durch die Deletion von *PYC2* die Biotinmangelantwort (1,3x) schon fast nicht mehr gegeben war (Abb. 3-29; vgl. auch Abb. 3-24).

Damit ist gezeigt, dass funktionelle Pyruvatcarboxylasen, insbesondere Pyc2p, für die Wahrnehmung von Biotin essentiell sind. Da die mutierten nicht-biotinylierbaren Apoformen der Pyruvatcarboxylasen keine Steigerung der Biotinmangelantwort erzielten, konnte ein möglicher Einfluss des Biotinylierungsgrades der Pyc-Proteine auf das Biotinsystem nicht eindeutig geklärt

werden. Aufgrund der Ergebnisse mit *pyc1 PYC2-9Myc* ist es wahrscheinlich, dass der C-Terminus der Pyc-Proteine wichtig für die Biotinwahrnehmung in Hefe ist.

3.3 Ungerichtete Mutagenese zur Aufklärung der Signalkette

Zur Aufklärung der Biotinwahrnehmung in *S. cerevisiae* wurden in den bisher gezeigten Tests die Beiträge von Proteinen aus dem Biotinmetabolismus zur Biotinmangelantwort gezielt untersucht. Eine alternative Herangehensweise ist es, durch ungerichtete EMS-Mutagenese Mutanten zu erzeugen, deren Biotinwahrnehmung gestört ist, und diese anschließend zu analysieren.

Um die gewünschten Mutanten identifizieren zu können, ist es sinnvoll, das zu untersuchende System mit einem eindeutigen Wachstumsphänotyp zu koppeln. In diesem Fall könnte man also z.B. eine *VHT1*-Promotor-*HIS3*-Fusion in dem Histidin-auxotrophen Stamm W303-1A (*MATa*, *ade2-1*, *ura3-1*, *his3-11,15*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *can1-100*) genomisch integrieren. So würden bei Anzucht der Zellen unter Biotinmangel der *VHT1*-Promotor aktiviert, *HIS3* verstärkt exprimiert und die Zellen Histidin-prototroph. Allerdings besaß der *VHT1*-Promotor auch unter Normal-Biotinbedingungen eine Grundaktivität. Dies war schon bei früheren β -Galaktosidasetests (Abb. 3-3) deutlich geworden und wurde hier nochmal mit Hilfe eines Overlay-Tests (Abb. 3-30) gezeigt. Die Expression des Biotintransporters unter Normalbedingungen ist für die Zelle notwendig, da sie Biotin nicht *de novo* synthetisieren kann und somit immer auf den Import von Biotin angewiesen ist.

Es wurde untersucht, ob ein kurzes Stück aus dem *VHT1*-Promotor, fusioniert mit *HIS3*, eine bessere Ausgangssituation erzeugt. Hierzu wurde das *VHT1*-Promotorfragment A (134 bp inklusive BRE-Sequenz; vgl. Abb. 3-6), integriert in den UAS-freien Promotor von *MEL1* aus pMEL β 2, ausgewählt. Im β -Galaktosidasetest waren nämlich mit pMEL β 2-Fragment A bei Normal-Biotinbedingungen geringe β -Galaktosidaseaktivitäten gemessen worden, die aber bei Biotinmangel stark angestiegen waren (Abb. 3-6). Auch im Overlay-Test war das Ergebnis ähnlich. Bei den plasmidtragenden Hefen auf Normal-Biotinplatten (2 μ g/l Biotin) war keine Blaufärbung der Zellen und damit keine β -Galaktosidaseaktivität zu beobachten. Wuchsen die Zellen jedoch auf Niedrig-Biotinplatten (0,2 μ g/l bzw. 0,02 μ g/l Biotin), waren die Zellen stark blau gefärbt (Abb. 3-30).

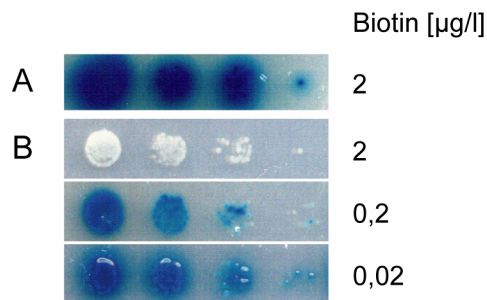


Abb. 3-30: Overlay-Test zur Prüfung der Reporterplasmide *VHT1-lacZ* und *pMELβ2-Fragment A*. Mit W303-1A-Stämmen, die (wie angezeigt) als Reporterplasmide *VHT1-lacZ* (A), bzw. *pMELβ2-Fragment A* (B) trugen, wurden β -Galaktosidase-Aktivitätstests mittels Overlayverfahren durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf Minimalmedium-Platten mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen (wie angezeigt) ausgebracht und nach zwei Tagen Wachstum bei 30 °C mit Overlaylösung überschichtet. Die sich anschließende Blaufärbung der Zellen wurde nach 6 Tagen dokumentiert. Der Stamm mit dem Plasmid *VHT1-lacZ* zeigte jedoch auch schon nach einem Tag ein ähnliches Bild. Bei dem Kontrollstamm W303-1A *pMELβ2* blieb bei allen drei Biotinkonzentrationen eine blaue Färbung aus.

Für die Integration einer Minimalpromotor-Fragment A-*HIS3*-Fusion ins Genom von W303-1A wurde der integrative Vektor YIpMEL β 2 verwendet. Hierzu wurde die *MEL1-lacZ*-Sequenz in YIpMEL β 2 gegen die Minimalpromotor-Fragment A-Sequenz aus dem Plasmid pMEL β 2-Fragment A und *HIS3* aus dem Plasmid *VHT1-HIS3* ausgetauscht und anschließend der *URA3*-Marker gegen einen *LEU2*-Marker gewechselt. Das erhaltene Plasmid YIpMEL β 2-Fragment A-*HIS3-LEU2* wurde dann zur Integration ins *leu2*-Gen von W303-1A im *LEU2*-Markergen geschnitten und in W303-1A transformiert. Der so erzeugte Stamm W303-1A *leu2::YIpMELβ2-Fragment A-HIS3-LEU2* wurde W303-1A VPA-*HIS3* (VPA steht für *VHT1*- Minimalpromotor-Fragment A) genannt.

Zur Überprüfung des Wachstums von W303-1A VPA-*HIS3* bei Biotinmangel wurde der Stamm auf Minimalmedium-Platten mit und ohne Histidin und mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen ausgebracht (Abb. 3-31).

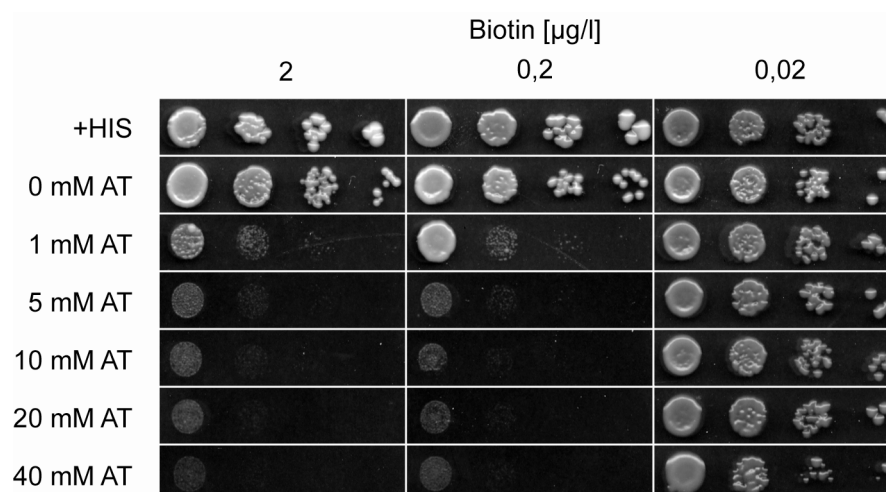


Abb. 3-31: Wachstumsphänotyp von W303-1A VPA-*HIS3* bei unterschiedlichen Biotinkonzentrationen. Zur Überprüfung des Wachstumsphänotyps von W303-1A VPA-*HIS3* wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Der Stamm wurde dazu in unterschiedlichen Verdünnungen auf Minimalmedium-Platten mit und ohne Histidin, unterschiedlichen Biotinkonzentrationen, sowie verschiedenen AT-Konzentrationen (wie angezeigt) ausgebracht. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert.

Wie erhofft, zeigte sich der Stamm bei niedrigen Biotinkonzentrationen (0,2 und 0,02 µg/l Biotin) Histidin-prototroph. Er konnte aber auch unter Normal-Biotinbedingungen ohne externe Zugabe von Histidin wachsen. Um dieses Problem zu beheben, wurde den histidinfreien Platten 3-Amino-1,2,4-triazol (AT) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. AT ist ein kompetitiver Inhibitor der Imidazolglycerolphosphatdehydratase (IGP-Dehydratase), dem Genprodukt von *HIS3*, und kann das Wachstum der Zellen bei geringer *HIS3*-Expression unterdrücken [Klopotoski und Wiater, 1965; Struhl und Davis, 1977; Horecka und Sprague, 2000]. Schon ab einer Konzentration von 1 mM AT wurde der Stamm W303-1A VPA-*HIS3* bei 2 µg/l Biotin deutlich im Wachstum gehemmt und ab einer Konzentration von 5 mM AT wuchsen keine Kolonien mehr (Abb. 3-31). Ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Effekt war bei einer Biotinkonzentration von 0,2 µg/l zu beobachten. Zog man die Zellen jedoch unter starkem Biotinmangel (0,02 µg/l Biotin) an, war das Wachstum auch bei einer Konzentration von 40 mM AT nicht beeinträchtigt (Abb. 3-31). Für die nachfolgenden Tests wurde eine AT-Konzentration von 20 mM gewählt, womit eine Unterscheidung mit Hilfe des Wachstumsphänotyps zwischen Zellen mit (Zellen sind Histidin-prototroph) und ohne Biotinmangelantwort (Zellen sind Histidin-auxotroph) eindeutig möglich war.

Mit diesem System hat es nun mehrere Möglichkeiten gegeben Klone zu identifizieren, die eine gestörte Biotinwahrnehmung besaßen. Nach einer Mutagenese mit EMS konnten entweder Klone gesucht werden, die eine konstitutive Biotinmangelantwort zeigten und sich somit auch unter Normal-Biotinbedingungen Histidin-prototroph verhielten (I). Oder man identifizierte Klone, bei denen die Biotinmangelantwort defekt war und die bei Biotinmangel Histidin-auxotroph waren und nicht mehr auf MMA-His/+20 mM AT-Platten wachsen konnten (II). Schließlich konnte man den Stamm W303-1A VPA-*HIS3* auch ohne EMS-Mutagenese mit einer „multi-copy“-Genbank transformieren und nach Klonen mit einem veränderten Wachstumsverhalten suchen (III).

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Ansätze (I) und (III) gezeigt. Die Methode (II) wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Sandra Balser bearbeitet.

3.3.1 EMS-Mutagenese und Identifizierung von Klonen mit konstitutiver Biotinmangelantwort

Wie zuvor beschrieben ist der Stamm W303-1A VPA-*HIS3* geeignet, mutagenisierte Klone mit einer gestörten Biotinwahrnehmung zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden nun EMS-Klone erzeugt, die ein konstitutives Biotinmangelsignal aufwiesen, und sich deshalb, im Gegensatz zum

unmutagenisierten Stamm, bei Normal-Biotinbedingungen Histidin-prototroph verhielten. Diese Klone konnten eine ausreichende Konzentration von Biotin nicht mehr adäquat wahrnehmen und werden im folgenden BHB („blind for high biotin“) genannt.

Zunächst wurde der Stamm 100 min mit EMS mutagenisiert (vgl. Kapitel 2.2.2.13). EMS (Ethylmethansulfonat) ist ein ethylierendes Mutagen, welches z.B. häufig durch die Alkylierung von Guanin zu O⁶-Ethylguanin zu GC→AT-Transitionen in der DNA führt [Sega, 1984; Vidal *et al.*, 1995; Greene *et al.*, 2003]. Die Inkubationsdauer mit dem Mutagen wurde dabei so berechnet, dass die Überlebensrate etwa 10 % betrug (in diesem Fall 11,3 %) und somit die überlebenden Klone voraussichtlich mindestens eine Mutation trugen. Zur Selektion wurden die mutagenisierten Zellen auf MMA-His/-Leu/+20 mM AT-Platten (1x Biotin) ausgebracht, auf denen nur die gewünschten Klone wachsen sollten. Mit 24 Platten und etwa 600 Klonen/Platte betrug die Gesamtzahl an untersuchten Klonen 14400. Nach 5 Tagen Wachstum bei 30 °C wurden die 100 größten Kolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Um die Güte der 87 wieder angewachsenen Klone einzustufen, wurden zunächst alle Klone mittels Western Blot-Analyse auf eine im Vergleich zum WT-Stamm erhöhte Bio2p-Expression überprüft (Abb. 3-32). Wie schon erwähnt, gehört *BIO2* zu den Biotingenen und wird bei einem Biotinmangelsignal verstärkt exprimiert (vgl. Abb. 3-8; Abb. 3-11; Abb. 3-13).

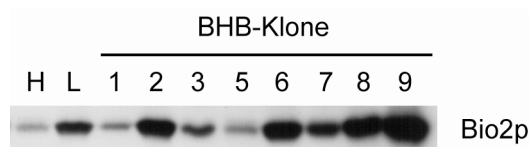


Abb. 3-32: Western Blot zur Überprüfung der *BIO2*-Expression der BHB-Klone. Für die Western Blot-Analyse wurden die Klone in Normal-Biotinmedium (2 µg/l Biotin) bis zu einer OD₆₀₀ ≅ 1 angezogen und jeweils 5 OD zur Gewinnung des Gesamtzellextraktes geerntet. Die Blots wurden zur Detektion von Bio2p mit anti-Bio2p-Serum dekoriert. In der Abbildung sind als Beispiel die BHB-Klone 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 9 gezeigt. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm W303-1A VPA-*HIS3* nach Anzucht in Normal (H)- bzw. Niedrig (L)-Biotinmedium (2 µg/l bzw. 0,2 µg/l Biotin).

In diesem Test zeigten z.B. die Klone BHB 1 und BHB 5 eine unveränderte, der Klon BHB 3 eine geringfügig erhöhte und der Klon BHB 7 eine erhöhte Bio2-Expression, die etwa der des WT-Stammes unter Biotinmangelbedingungen entspricht. Bei den BHB-Klonen 2, 6, 8 und 9 war die Bio2-Expression sogar stärker als im WT induziert (Abb. 3-32). Eine Zusammenfassung der Charakterisierung der 44 Klone mit erhöhter *BIO2*-Expression ist in Tab. 3-5 (Seite 93) gezeigt. Die Eigenschaften dieser Klone wurden bei den nachfolgenden Tests noch ausführlicher untersucht.

Ein weiteres Kriterium zur Klassifizierung der BHB-Klone war ihre Resistenz gegen AT. Dazu wurde das Wachstum der Klone auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit AT-Konzentrationen von 0 mM bis 100 mM untersucht (Abb. 3-33).

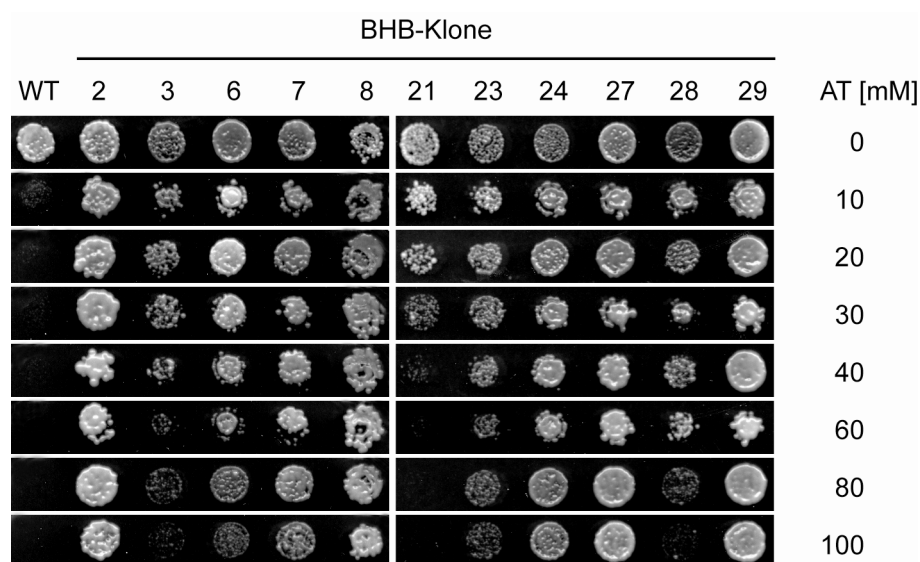


Abb. 3-33: Wachstumstest der BHB-Klone bei verschiedenen AT-Konzentrationen. Zur Überprüfung des Wachstumsphänotyps wurde mit dem Ausgangsstamm W303-1A VPA-*HIS3* (WT) und den BHB-Klonen ein Wachstumstest durchgeführt. Die Stämme wurden dazu ohne Einstellung der OD₆₀₀ in Wasser resuspendiert und in einer 1:25-Verdünnung auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit unterschiedlichen AT-Konzentrationen ausgebracht. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. In der Abbildung sind als Beispiel die BHB-Klone 2, 3, 6, 7, 8, 21, 23, 24, 27, 28 und 29 gezeigt.

Viele der BHB-Klone zeigten eine hohe AT-Resistenz (Abb. 3-33, Tab. 3-5, Seite 93). Die Klone 3 und 28 waren z.B. noch auf Platten mit 80 mM AT und die Klone 6, 7 und 23 auf Platten mit 100 mM AT lebensfähig. Die Klone 2, 8, 24, 27 und 29 wuchsen sogar noch sehr gut auf 100 mM AT (Abb. 3-33). Nur die drei Klone BHB 21 (Wachstum bis 30 mM AT; Abb. 3-33), BHB 50 (60 mM AT) und BHB 52 (40 mM AT) konnten nur bei relativ geringen AT-Konzentrationen wachsen. Klon 97 war bei diesem Test nicht gewachsen und konnte deshalb nicht eingeordnet werden (Tab. 3-5, Seite 93).

Da bei Zellen mit konstitutiver Biotinmangelantwort alle Biotingene aktiviert sein sollten, somit auch *VHT1* und *BPL1*, und bei den Testbedingungen kein externer Biotinmangel vorherrschte, sollte sich die Biotinylierung der BHB-Klone nicht von der des WT-Stammes unterscheiden. Bei einigen Klonen (z.B. BHB 62, 63, 65, 68, 71, 72, 76, 86, 89 und 90) fiel jedoch eine Unterbiotinylierung, vor allem von Arc1p, auf (Abb. 3-34, Tab. 3-5, Seite 93). Gründe dafür könnten Mutationen in den Genen *VHT1* oder *BPL1* sein. Eine Herabsetzung der Aktivität der jeweiligen Enzyme führte sowohl zu einer Biotinmangelantwort als auch zu einer geringeren

Biotinylierung der biotintragenden Proteine (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.3). Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass ein Stamm neben der zum BHB-Phänotyp führenden Mutation auch zufällig eine Mutation im *ARC1*-Gen trug. Wie die Untersuchungen mit *arc1*-Deletionsmutanten belegen, kann allerdings das Ausfallen von Arc1p allein keinen BHB-Phänotyp verursachen (vgl. Kapitel 3.2.4).

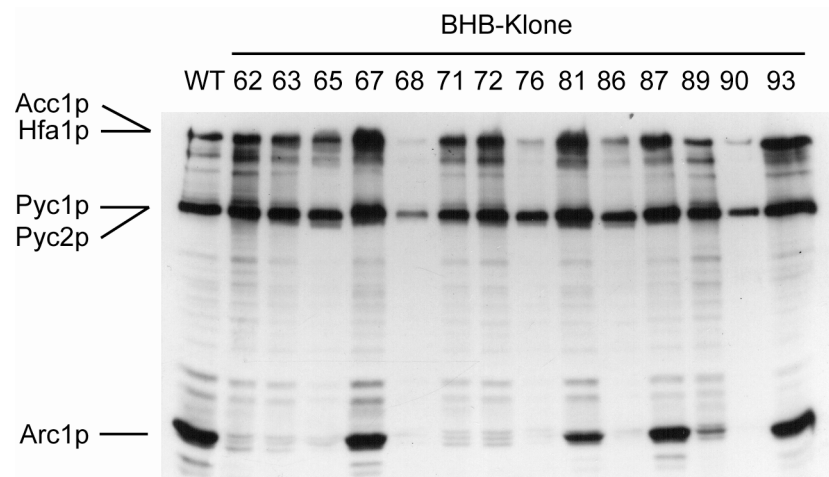


Abb. 3-34: Western Blot zur Überprüfung des Biotinylierungsgrads der BHB-Klone. Für die Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Biotinylierungsgrads wurden die Proteinextrakte der BHB-Klone aus dem *BIO2*-Expressionstest (vgl. Abb. 3-32) verwendet. Die Blots wurden zur Detektion der biotinylierten Proteine mit Strep-PO dekoriert. In der Abbildung sind als Beispiel die Banden der biotintragenden Proteine verschiedener BHB-Klone (wie angegeben) gezeigt. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm W303-1A *VPA-HIS3* (WT) nach Anzucht in Normal-Biotinmedium (2 µg/l Biotin).

Um die BHB-Klone, bei denen die Ursache für den AT-Phänotyp in einem Defekt im *VHT1*- oder *BPL1*-Gen lag, herauszufiltern, wurde ein Komplementationstest durchgeführt. Alle Klone, die eine Unterbiotinylierung aufwiesen oder bei denen die Biotinylierung der Biotinproteine nicht bestimmt wurde, wurden mit *CEN*-Plasmiden, die das *VHT1*- bzw. *BPL1*-Gen trugen (YCplac33-*VHT1* bzw. pCA21-*BPL1*), bzw. mit einem Kontroll- Plasmid (YCplac33) transformiert und auf MMA-His/-Leu/+20 mM AT-Platten getestet (Abb. 3-35). Die plasmid-codierten Proteine würden den Defekt in den genannten Genen komplementieren und die betreffenden Klone hätten dann ihren AT-Phänotyp verloren.

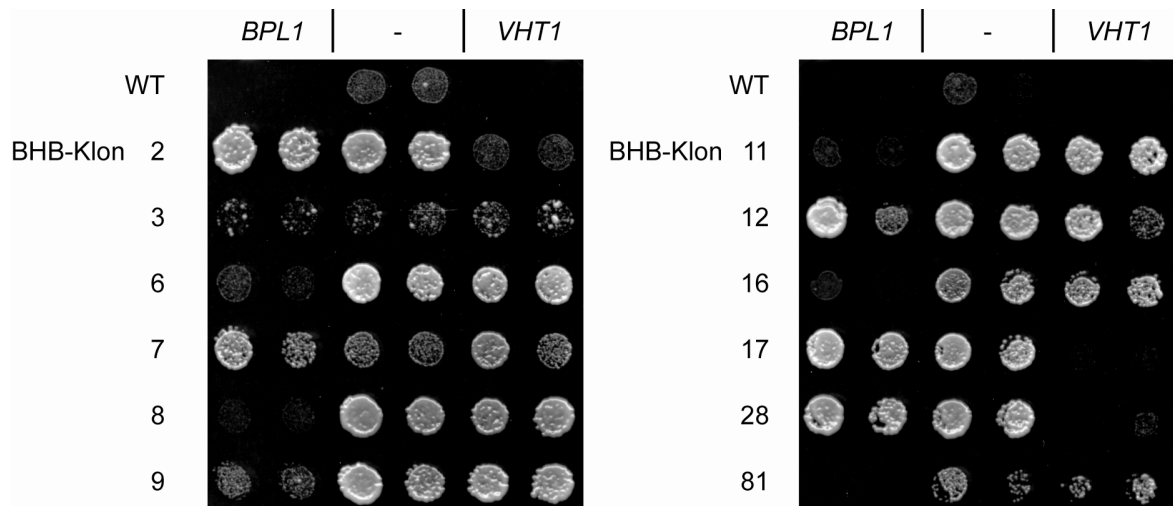


Abb. 3-35: -Komplementation der BHB-Klone durch *VHT1*-bzw. *BPL1*. Die zu untersuchenden BHB-Klone wurden mit den Plasmiden YCplac-*VHT1*, pCA21-*BPL1* bzw. YCplac33 transformiert. Für den Wachstumstest zur Analyse der AT-Resistenz wurden die Transformanten ohne Einstellung der OD₆₀₀ in Wasser resuspendiert und in zwei Verdünnungsstufen auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit 20 mM AT ausgebracht. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. In der Abbildung sind als Beispiel die BHB-Klone 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 17, 28 und 81 gezeigt.

Wie aus Abb. 3-35 ersichtlich wird, konnten die BHB-Klone 2, 17 und 28 mit YCplac33-*VHT1* nicht mehr auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit 20 mM AT wachsen und schienen somit einen Defekt im *VHT1*-Gen zu besitzen. Defekte im *BPL1*-Gen hatten vermutlich die Klone 6, 8, 9, 11, 16 und 81. Keine Veränderung im Wachstum zeigten die Klone 3, 7 und 12. Die Ergebnisse des Komplementationstests für alle untersuchten Klone sind in Tab. 3-5 (Seite 93) aufgeführt.

Um die Aussagekraft des Wachstumstests zu untermauern, wurden einige der transformierten Klone zusätzlich auf eine Veränderung des Biotinylierungsmusters überprüft (Abb. 3-36). Die Biotinylierung von Arc1p ist ein besonders sensibler Marker, da bei einer gestörten Biotinylierung der Biotinproteine infolge Biotinmangels, *vht1*-Deletion oder Bpl1p-Mangels Biotinyl-Arc1p nicht mehr detektiert werden kann (vgl. Abb. 3-11, 3-13B und 3-19C). Die Bande von Holo-Acc1p/Hfa1p erschien wegen unvollständigen Transfers während des Blots sehr variabel.

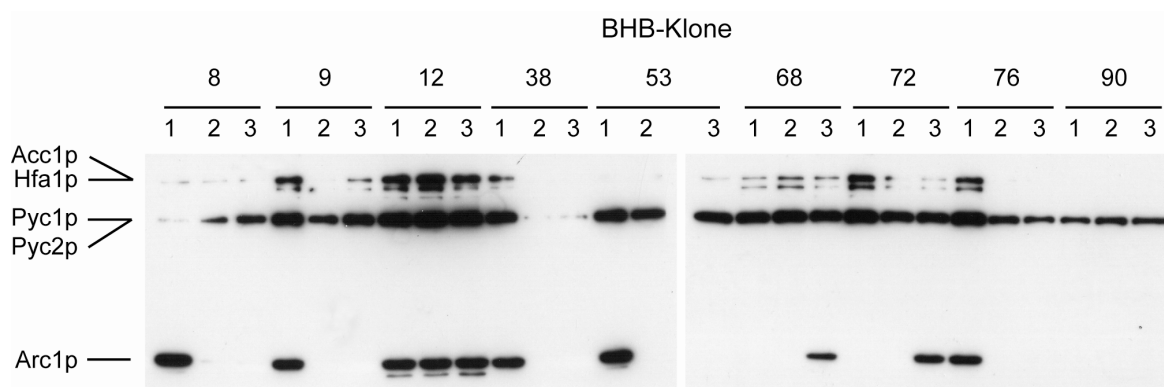


Abb. 3-36: Westernblot zur Beurteilung einer *VHT1*-bzw. *BPL1*-Komplementation der BHB-Klone. Verschiedene BHB-Klone (wie angezeigt) mit den Plasmiden pCA21-*BPL1* (1), YCplac33 (2) bzw. YCplac33-*VHT1* wurden in Normal-Biotinmedium (2 µg/l) bis zu einer $OD_{600} \cong 1$ angezogen und jeweils 5 OD zur Gewinnung des Gesamtzellextraktes geerntet. Die Blots wurden zur Detektion der biotinylierten Proteine mit Strep-PO dekoriert.

Die Ergebnisse deckten sich mit denen aus dem Wachstumstest. Die Klone 8, 9, 38, 53 und 76 zeigten eine verbesserte Biotinylierung nach Transformation des *BPL1*-Gens, die Klone 68 und 72 hingegen bei zusätzlicher *VHT1*-Expression (Abb. 3-36). Das Biotinylierungsmuster der Klone 12 und 90 wurde nicht von *BPL1* oder *VHT1* beeinflusst.

In folgender Tabelle (Tab. 3-5; Fortsetzung nächste Seite) sind die bisher erhaltenen Ergebnisse zur Charakterisierung der BHB-Klone zusammengefasst (Kreuzung vorweggenommen).

BHB-Klon	Bio2p	AT [mM]	Arc1p-Biotinylierung	Komplementationstests			Bemerkung
				Wachstum	Western Blot	Kreuzung	
2	2	100+	n.b.	<i>VHT1</i>		<i>VHT1</i>	
6	2	100	n.b.	<i>BPL1</i>			
8	2	100+	0	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>	
9	2	100+	0	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>	
24	2	100+	0	?		<i>VHT1</i>	
28	2	80	0,5	<i>VHT1</i>			
29	2	100+	0,5	<i>VHT1</i>			
38	2	100+	0	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>		
41	2	80	0	<i>VHT1</i>			
48	2	100+	0	<i>BPL1</i>			
53	2	100+	0	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>		
57	2	100	0	-		<i>VHT1</i>	(2)
59	2	100+	0	<i>BPL1</i>			
62	2	100+	0	<i>BPL1</i>			
63	2	100+	0	<i>VHT1</i>			
65	2	100	0	<i>VHT1</i>			(2)
68	2	100	0	<i>VHT1</i>	<i>VHT1</i>		(2)
71	2	100+	0	?		<i>VHT1</i>	

BHB-Klon	Bio2p	AT [mM]	Arc1p-Biotinylierung	Komplementationstests			Bemerkung
				Wachstum	Western Blot	Kreuzung	
72	2	100+	0	<i>VHT1</i>	<i>VHT1</i>		
76	2	100+	0	-	<i>BPL1</i>	<i>BPL1</i>	(3)
81	2	80	0,5	<i>BPL1</i>		<i>BPL1</i>	
86	2	100	0	-			(2)
89	2	100+	0,5	<i>VHT1</i>			(2)
90	2	100	0	-	-	<i>VHT1</i>	(2)
95	2	100+	0	-		<i>BPL1</i>	(2)
97	2	-	0	<i>VHT1</i>			(1), (2)
7	1	100	n.b.	-			
11	1	100	n.b.	<i>BPL1</i>			
12	1	100+	1	-	-		
14	1	100+	0	<i>BPL1</i>			
17	1	100+	n.b.	<i>VHT1</i>			
27	1	100+	1	-			
37	1	80	1				
46	1	100+	1				
56	1	80	1				
93	1	100+	1				
3	0,5	80	n.b.	?			(2)
16	0,5	100	n.b.	<i>BPL1</i>			
21	0,5	30	1				
23	0,5	100	1				
50	0,5	60	1				
52	0,5	40	1				
67	0,5	100+	1				
87	0,5	80	1				

Tab. 3-5: Charakterisierung BHB-Klone. In der Tabelle sind die Ergebnisse der Tests zur Charakterisierung der BHB-Klone, welche zumindest eine leicht erhöhte *BIO2*-Expression zeigten, aufgeführt. Die Sortierung der Klone erfolgte zunächst nach Stärke der *BIO2*-Expression und dann nach Klonnummer. **Bio2p:** Stärke der *BIO2*-Expression mit 0,5 = leicht erhöht; 1 = wie WT-Stamm nach Biotinmangel, 2 = stark erhöht; **AT [mM]:** Konzentration an AT, bei der noch Wachstum möglich war, mit 100+ = noch sehr gutes Wachstum bei 100 mM AT; **Arc1p-Biotinylierung:** Biotinylierungsgrad, gemessen vor allem an der Biotinylierung von Arc1p, mit 1 = wie WT, 0,5 bzw. 0 = vermindert bzw. stark vermindert, n.b. = nicht bestimmt; **Wachstum/ Westernblot/ Kreuzung:** Ergebnisse vgl. Abb. 3-35, Abb. 3-36 und Abb. 3-39 mit *VHT1/ BPL1* = Komplementation durch *VHT1/ BPL1*-Plasmid, - = keine Komplementation durch *VHT1/ BPL1*-Plasmid, ? = keine genaue Aussage möglich; **Bemerkung:** (1) = kein Wachstum bei AT-Test, (2) = schlechtes Wachstum bei Wachstumskomplementationstest, (3) = Komplementation nach Wachstumstest und Western Blot unklar; **leere Kästchen:** keine Bestimmung durchgeführt. **fett gedruckt:** die fett gedruckten Klone wurden rückgekreuzt und in den Komplementationstest eingesetzt.

Wie schon erwähnt, hatten nur 44 der 87 BHB-Klone eine im Vergleich zum WT-Stamm verstärkte Bio2p-Expression bei Normal-Biotinbedingungen. Innerhalb dieser Gruppe gab es 26 Klone mit stark erhöhter Bio2p-Expression, 10 mit einer Bio2p-Expression wie der WT-Stamm bei Biotinmangel und 8 mit nur leicht verstärkter Bio2p-Expression gegenüber der beim WT unter Normal-Biotinbedingungen. Auffällig ist, dass alle Klone mit stark erhöhter Bio2p-Expression auch eine verminderte Arc1p-Biotinylierung aufwiesen (bei BHB 2 und 6 wurde die

Biotinylierung nicht bestimmt) und die meisten vermutlich einen Defekt im *VHT1*- oder *BPL1*-Gen trugen und damit für die Aufklärung des Biotinmangelsignalwegs uninteressant waren. Im Gegensatz dazu zeigten die restlichen Klone (soweit bestimmt) bis auf BHB 14 eine dem WT vergleichbare Biotinylierung der biotintragenden Proteine. Außerdem wurde die AT-Resistenz von zwei aus dieser Gruppe getesteten BHB-Klonen (BHB 12 und BHB 27) durch die *VHT1*- bzw. *BPL1*-Plasmide nicht verändert.

Schließlich blieben bei den BHB-Klonen mit stark erhöhter Bio2p-Menge vier Klone ohne *VHT1*/*BPL1*-Komplementation und drei, bei denen die Komplementationstests keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, für die weitere Aufklärung der Biotinwahrnehmung in Hefe interessant. Bei den Klonen mit leicht bis mittel erhöhter Bio2p-Expression waren drei weder durch *VHT1* noch *BPL1* komplementierbar, bei einem war das Ergebnis nicht eindeutig und 10 wurden nicht getestet.

Der nächste Schritt zur Charakterisierung der BHB-Klone war das Rückkreuzen der Klone mit einem WT-Stamm und die Einteilung in Komplementationsgruppen. Da die EMS-Mutagenese auf eine Überlebensrate von etwa 10 % eingestellt wurde, war es wahrscheinlich, dass einige der BHB-Klone mehrere Mutationen trugen. Durch das Rückkreuzen konnte man zum einen die Mutationen, die nicht für die erhöhte AT-Resistenz verantwortlich waren, ausdünnen und damit eventuell das Wachstum und den Phänotyp der Klone verbessern, zum anderen gewann man Nachkommen mit unterschiedlichen Paarungstypen. Diese wurden für das Kreuzen der BHB-Klone zur Bestimmung von Komplementationsgruppen benötigt.

Für das Rückkreuzen wurden zunächst 9 BHB-Klone aus der Gruppe mit stark erhöhter Bio2p-Expression ausgewählt. Dazu gehörten die Klone 24, 57, 71, 76, 90 und 95, die bei den bisherigen Tests nicht oder nicht eindeutig durch *VHT1* bzw. *BPL1* komplementiert wurden. Des Weiteren wurde ein Klon mit *VHT1*-Komplementation (BHB 2) und zwei Klone mit *BPL1*-Komplementation (BHB 8 und 81) eingesetzt. Da der Ausgangsstamm der BHB-Klone W303-1A VPA-HIS3 (*MATa*, *ade2-1*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can1-100*) war und zum Rückkreuzen (vgl. Kapitel 2.2.1.5) W303-1B U (*MATa*, *ade2-1*, *his3-11,15*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *can1-100*) verwendet wurde, wurden die diploiden Klone auf MMA-Ura/-Leu-Platten selektiert. Anschließend erfolgte die Sporulation der Diploiden und die Vereinzelnung der Sporen (vgl. Kapitel 2.2.1.6).

Zur Analyse der Phänotypen wurden nur Sporen aus vollständig erhaltenen Tetraden eingesetzt. Dazu wurden diese auf YPD-Platten und auf Platten mit MMA-Ura, MMA-Leu und MMA-Leu/-His/+20 mM AT ausgebracht (Abb. 3-37).

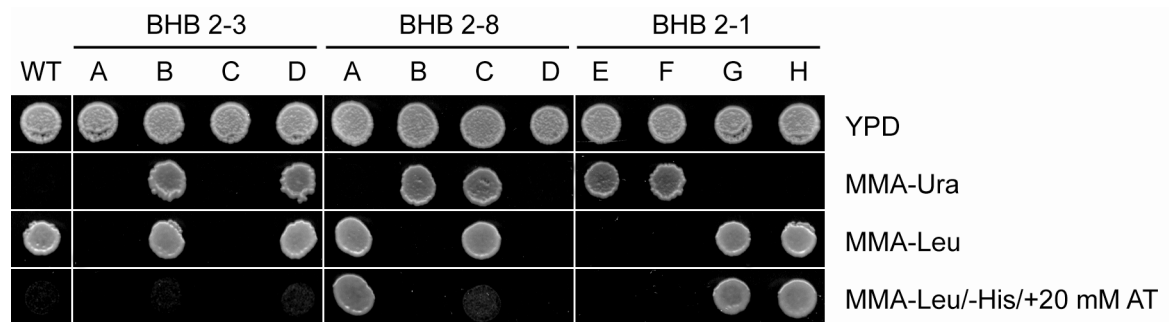


Abb. 3-37: Bestimmung der Phänotypen der BHB-Sporen nach erster Rückkreuzung. Zur Überprüfung der Phänotypen wurde mit den BHB-Sporen ein Wachstumstest durchgeführt. Die Sporen wurden dazu ohne Einstellung der OD_{600} in Wasser resuspendiert und in einer 1:50-Verdünnung auf YPD und auf verschiedene Minimalmedium-Platten (wie angezeigt) ausgebracht. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. In der Abbildung sind als Beispiel die Sporen aus den Tetraden BHB 2-3, BHB 2-8 und BHB 2-1 gezeigt. Als Kontrollstamm diente der Ausgangsstamm W303-1A VPA-*HIS3* (WT).

Wie erwartet, haben sich die Marker $URA3^+$ und $LEU2^+$ aus den beiden Elternstämmen (BHB-Klone und W303-1B U) 2:2 auf die Nachkommen verteilt (Abb. 3-37). Die Mutationen, welche die erhöhte AT-Resistenz in den BHB-Klonen hervorriefen, sind vermutlich auch 2:2 auf die Nachkommen vererbt worden. Allerdings wurde der AT-Phänotyp nur sichtbar, wenn gleichzeitig die VPA-*HIS3*-Kassette vererbt wurde. So kam es vor, dass aus einer Tetrade keine, eine oder zwei Sporen eine erhöhte AT-Resistenz zeigten (Abb. 3-37).

Darauf folgend wurden die Paarungstypen der Sporen mit erhöhter AT-Resistenz bestimmt. Dazu wurden zunächst die Ura⁻-Klone mit W303-1A U (*MATa*) bzw. W303-1B U (*MATa*) gekreuzt und zur Selektion der diploiden Stämme auf MMA-Ura/-Leu-Platten ausgebracht (Abb. 3-38). Da diploide Zellen sich nur dann bildeten, wenn die beiden gekreuzten Stämme gegensätzliche Paarungstypen aufwiesen, konnte den BHB-Sporen eindeutig ein Paarungstyp zugeordnet werden. So waren z.B. die Sporen BHB 2-1B, BHB 2-6B, BHB 2-8A, BHB 2-1G, BHB 2-2G vom Typ *MATa* und BHB 2- 1H, BHB 2-3E und BHB 2- 4E vom Typ *MATa* (Abb. 3-38).

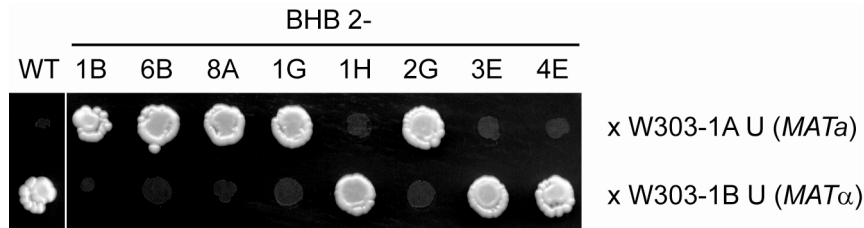


Abb. 3-38: Wachstumstest zur Bestimmung der Paarungstypen der BHB-Sporen aus erster Rückkreuzung. Zur Überprüfung der Paarungstypen wurden die BHB-Sporen mit in Wasser resuspendierten und in Mikrotiterplatten vorgelegten Zellen der Stämme W303-1A U bzw. W303-1B U vermenzt und auf YPD-Platten mit Hilfe eines Metallstempels ausgebracht. Nach 2 Tagen Wachstum bei 30 °C wurden Zellen mit Hilfe des Stempels abgenommen, in Wasser resuspendiert und auf Doppelselektionsplatten (MMA-Ura/-Leu) ausgebracht. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. In der Abbildung sind als Beispiel verschiedene Sporen von BHB 2 gezeigt. Als Kontrollstamm diente der Ausgangsstamm W303-1A VPA-*HIS3* (WT).

Zum Testen der Ura⁺-Klone (*MATa*, *ade2-1*, *trp1-1*, *can1-100*) wurde das gleiche Verfahren wie oben angewandt. Diesmal wurden die Testkreuzungen jedoch mit den Stämmen W303-1A YCplac22 (*TRP1*⁺-Plasmid in *MATa*, *ade2-1*, *ura3-1*, *his3-11,15*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *can1-100*) und W303-1B YCplac22 (*TRP1*⁺-Plasmid in *MATα*, *ade2-1*, *ura3-1*, *his3-11,15*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *can1-100*) durchgeführt und zur Selektion der Diploiden MMA-Ura/-Trp-Platten verwendet. Dabei wurden bei beiden Tests nur Klone aus Tetraden mit 2:2 *URA3*⁺- und 2:2 *LEU2*⁺-Verteilung berücksichtigt. Für die nachfolgenden Studien wurden, soweit möglich, von jedem BHB-Klon jeweils 2 Sporen mit Ura⁺-Phänotyp (Paarungstypen *MATa* und *MATα*) und jeweils 2 Sporen mit Ura⁻-Phänotyp (Paarungstypen *MATa* und *MATα*) ausgesucht und in Dauerkultur genommen. Die Phänotypen dieser Sporen sind im Anhang aufgelistet.

Nachdem sowohl die Phänotypen als auch die Paarungstypen der BHB-Nachkommen bestimmt waren, wurde der Test zur Einteilung der BHB-Klone in Komplementationsgruppen durchgeführt. Dazu wurden die BHB-Klone 2-1H, 8-3A, 24-5G, 57-4E, 71-6D, 76-1D, 81-6G, 90-6G und 95-4E (jeweils *MATa*, *ade2-1*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can1-100*) mit dem *TRP1*-Plasmid YCplac22 transformiert und mit den BHB-Klonen 2-8G, 8-1C, 24-3H, 57-5E, 71-5C, 76-3A, 81-3B, 90-7F und 95-1G (jeweils *MATα*, *ade2-1*, *trp1-1*, *can1-100*) sowie dem WT-Stamm W303-1B U gekreuzt. Nach der Selektion der Diploiden wurden diese zur Überprüfung der AT-Resistenz auf MMA-His/-Leu/-Trp/-Ura/+20 mM AT-Platten ausgebracht (Abb. 3-39).

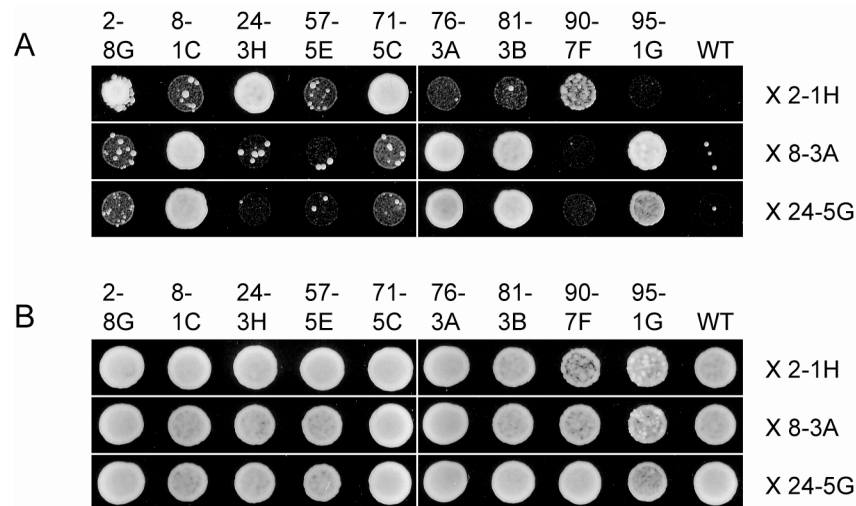


Abb. 3-39: Komplementationstest mit BHB-Sporen aus erster Rückkreuzung. *A*, Die BHB-Sporen vom Typ Ura^+/MATa (obere Reihe) wurden mit den in Wasser resuspendierten und in Mikrotiterplatten vorgelegten Zellen der BHB-Sporen vom Typ Ura^-/MATa mit TRP1^+ -Plasmid (hier z.B. 2-1H, 8-3A, 24-5G) vermengt und auf YPD-Platten mit Hilfe eines Metallstempels ausgebracht. Nach 1 Tag Wachstum bei 30 °C wurden Zellen mit Hilfe des Stempels abgenommen, in Wasser resuspendiert und zunächst auf Doppelselektionsplatten (MMA-Ura/-Trp) ausgebracht. Nach 4 Tagen bei 30 °C wurden die Diploiden mit derselben Methode auf MMA-His/-Leu/-Ura/-Trp/+20 mM AT überführt und nach weiteren 2 Tagen das Wachstum dokumentiert. Als Kontrollstamm diente der Ausgangsstamm W303-1B U (WT). *B*, Zur Kontrolle wurden hier die Diploiden aus (A) von der Doppelselektionsplatte auf MMA+His/-Leu/-Trp/-Ura überführt.

Hatten die gekreuzten BHB-Klone jeweils eine Mutation in demselben Gen und gehörten siesomit zu einer Komplementationsgruppe, so zeigte der aus beiden Klonen resultierende diploide Stamm weiterhin eine erhöhte AT-Resistenz. Dies war z.B. bei den Kreuzungen BHB 2-1H mit BHB 2-8G, 24-3H, 71-5C und 90-7F der Fall. Waren bei den Ausgangsstämmen unterschiedliche Gene betroffen oder wurde mit einem WT-Stamm gekreuzt (Kontrolle), so komplementierten sich die Genome und der diploide Stamm verlor die Fähigkeit auf 20 mM AT zu wachsen. Einen Verlust der AT-Resistenz zeigten z.B. die Kreuzungen BHB 2-1H mit BHB 8-1C, 57-5E, 76-3A, 81-3B und 95-1G (Abb. 3-39). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich in Tab. 3-6.

BHB	2-8G	24-3H	57-5E	71-5C	90-7F	8-1C	76-3A	81-3B	95-1G
2-1H	+	+	-	+	(+)	-	-	-	-
24-5G	+	+	-	+	(+)	-	-	-	-
57-4E	+	+	-	(+)	(+)	-	-	-	-
71-6D	+	+	-	+	+	(-)	-	-	-
90-6G	+	+	+	+	+	(-)	-	-	-
8-3A	-	-	-	-	-	+	+	+	+
76-1D	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)
81-6G	-	-	-	-	-	+	+	+	+
95-4E	-	-	-	-	-	+	(+)	+	n.b.

Tab. 3-6: Ergebnisse des BHB-Komplementationstests. Hier sind die Ergebnisse des Komplementationstests der BHB-Sporen aus Abb. 3-39 zusammengefasst. + = Sporen komplementierten sich nicht, Wachstum auf AT-Platten; (+) = Sporen komplementierten sich nicht, aber schlechteres Wachstum als bei „+“ auf AT-Platten; - = Sporen komplementierten sich, kein Wachstum auf AT-Platten; (-) = Sporen komplementierten sich, aber einzelne Kolonien sichtbar auf AT-Platten; n.b. = nicht bestimmt, da auch auf der Kontrollplatte nicht gewachsen; rot markiert = Komplementation mit *BPL1* möglich (vgl. Tab. 3-5, Seite 93); blau markiert = Komplementation mit *VHT1* möglich (vgl. Tab. 3-5, Seite 93).

Mit Hilfe von Tab. 3-6 wurden die BHB-Klone 24, 71 und 90 in die Komplementationgruppe von BHB 2 eingeteilt, womit sie vermutlich jeweils Mutationen im *VHT1*-Gen trugen (vgl. auch Tab. 3-5, Seite 93). Die Klone BHB 76 und 95 dagegen gehörten zur Gruppe der BHB-Klone 8 und 81 und waren somit vermutlich *bpl1*-Mutanten. Der BHB-Stamm 57 verhielt sich bei diesem Test nicht eindeutig, da der Klon 57-5E mit allen BHB-Klonen, außer mit BHB 90-6G, Komplementation zeigte (sogar mit sich selbst). Er wurde aber eher der Komplementationsgruppe von BHB 2 zugeordnet.

Damit wurden alle rückgekreuzten BHB-Klone für die Aufklärung der Signalkette bei Biotinmangel uninteressant. Die zu diesem Zweck verbliebenen, noch nicht rückgekreuzten 15

BHB-Klone wurden in Tab. 3-7 zusammengefasst, konnten aber im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr weiter charakterisiert werden.

BHB-Klon	Bio2p	AT [mM]	Arc1p-Biotinylierung	Komplementationstests	
				Wachstum	Western Blot
86	2	100	0	-	
7	1	100		-	
12	1	100+	1	-	-
27	1	100+	1	-	
37	1	80	1		
46	1	100+	1		
56	1	80	1		
93	1	100+	1		
3	0,5	80		?	
21	0,5	30	1		
23	0,5	100	1		
50	0,5	60	1		
52	0,5	40	1		
67	0,5	100+	1		
87	0,5	80	1		

Tab. 3-7: Verbliebene BHB-Klone zur Aufklärung der Biotinmangelsignalkette. Die Sortierung der Klone erfolgte nach Stärke der *BIO2*-Expression und dann nach Klonnummer. Bio2p: Stärke der *BIO2*-Expression mit 0,5 = leicht erhöht; 1 = wie WT-Stamm nach Biotinmangel, 2 = stark erhöht; AT [mM]: Konzentration an AT, bei der noch Wachstum möglich war, mit 100+ = noch sehr gutes Wachstum bei 100 mM AT; Arc1p-Biotinylierung: Biotinylierungsgrad, gemessen vor allem an der Biotinylierung von Arc1p, mit 1 = wie WT, 0 = stark vermindert; Wachstum/ Western Blot: Ergebnisse vgl. Abb. 3-35 und Abb. 3-36 mit - = keine Komplementation durch *VHT1*- und *BPL1*-Plasmid, ? = keine genaue Aussage möglich; leere Kästchen: keine Bestimmung durchgeführt.

3.3.2 Suche nach Genen, die bei Überexpression eine Biotinmangelantwort auslösen

Zur ungerichteten Aufklärung der Biotinsignalkette wurde neben der Erzeugung von BHB-Klonen mittels EMS-Mutagenese der Ausgangsstamm W303-1A VPA-*HIS3* mit einer „multi-copy“-Genbank transformiert. Klone, die sich im Gegensatz zum Ausgangsstamm auf Normal-Biotinplatten Histidin-prototroph verhielten, wurden identifiziert und deren Plasmide analysiert. Dabei wurde nach Genen gesucht, die bei Überexpression eine Biotinmangelantwort auslösten.

Die Transformation von W303-1A VPA-*HIS3* wurde mit 1,6 µg „multi-copy“-Genbankplasmiden (Genbank 45-C3 in YEp352: 2µ, *URA3*, *Amp^R*), hergestellt aus genomischer *S. cerevisiae*-DNA, durchgeführt und die Transformanten auf MMA-Ura/-His/-Leu/+20 mM AT-Platten ausgebracht. Damit fand gleichzeitig eine positive Selektion auf den Plasmidmarker (*URA3*) und die AT-Resistenz statt. Zur Beurteilung der Transformationsrate wurden Klone auf Platten mit MMA-

Ura/-Leu-Medium ausplattiert. Nach 6 Tagen Wachstum bei 30 °C wurden 33 Transformanten unterschiedlicher Größe (23 große bis kleine und 10 winzige Klone) auf den AT-Platten identifiziert und vereinzelt. Der Transformationsansatz ergab etwa 35000 Transformanten, wovon insgesamt etwa 20000 auf den Selektionsplatten untersucht wurden. Unter der Annahme, dass jedes Genbankplasmid etwa 2-3 Gene enthielt, ergab sich mit 40000-60000 untersuchten Genen eine 7-10x Abdeckung des Hefegenoms.

Darauf folgend wurden die Plasmide aus den Genbankklonen isoliert (dies gelang bei den Klonen 1-21, 23; 25-28; 30 und 32). Da der zum Auffinden der gewünschten Genbankklone verwendete AT-Phänotyp (Wachstum auf MMA-Ura/-His/-Leu/+20 mM AT-Platten) auch durch die Transformation von *HIS3* erzielt wird, wurden die isolierten Genbankplasmide zunächst zur Kontrolle mit den Restriktionsenzymen *Hind*III bzw. *Xma*I (= *Avr*II) und *Pst*I verdaut. Bei Vorhandensein von *HIS3* sollten DNA-Stücke von 187 bp bzw. 362 bp mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.2.2.9) sichtbar werden. Dies könnte auf die Plasmide 9, 16, 18, 20, 26 und 30 zutreffen (Daten nicht gezeigt). Allerdings war das Ergebnis wegen der kleinen, schlecht zu detektierenden DNA-Stücke nicht ganz eindeutig und die entsprechenden Plasmide wurden mittels PCR-Analyse (vgl. Kapitel 2.2.2.10; Primer JST 28 und JST 29) nochmals überprüft. Als Positivkontrolle wurde hierbei pRS313 (*CEN*, *HIS3*) und als Negativkontrollen Wasser bzw. die Plasmide 3 und 15 eingesetzt. Bei diesem Test zeigte keines der Genbankplasmide die bei Vorhandensein von *HIS3* erwartete 830 bp-PCR-Bande (Daten nicht gezeigt). Damit schien auch keines der untersuchten Genbankplasmide *HIS3* zu enthalten. Um eventuell identische Plasmide herauszufiltern, wurde versucht, Plasmide mit gleichem Restriktionsmuster zu finden. Dazu wurde neben den oben aufgeführten Tests ein weiterer Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Xho*I durchgeführt. Nach diesen drei verschiedenen Restriktionstests konnte allerdings kein einheitliches Muster bei den Plasmiden festgestellt werden.

Außerdem wurde überprüft, ob die erhöhte AT-Resistenz der Genbankklone auch wirklich plasmidabhängig war oder eventuell durch eine spontane Mutation der genomischen DNA ausgelöst wurde. Dazu wurden die isolierten Genbankplasmide erneut in den Stamm W303-1A VPA-*HIS3* transformiert, die Transformanten auf Minimalmedium-Platten mit 20 mM AT ausgebracht und die Retransformation quantifiziert (Tab. 3-8). 10 Plasmide (2, 3, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 20 und 23) erzeugten bereits nach einer Inkubationsdauer von 48 h Transformanten, bei 12 Ansätzen (Plasmide 1, 4, 5, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19 und 28) waren nach 5 Tagen Inkubation Transformanten gut sichtbar, bei drei Ansätzen (Plasmide 21, 26 und 32) waren nach dieser Zeit nur wenige Klone entstanden und bei den Transformationen 25, 27 und 30 war die Retransformation erfolglos.

Parallel zur Retransformation erfolgte die Einteilung der Genbankklone, ähnlich wie bei den BHB-Klonen (vgl. Abb. 3-33), nach Stärke der AT-Resistenz durch Wachstum auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit unterschiedlichen AT-Konzentrationen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-8 zusammengefasst.

Klon	AT-Konzentration [mM]											Rangfolge	Retransformation
	0	1	5	10	20	30	40	50	60	80	100		
7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3
8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3
23	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	4	3
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0,5	5	3
9	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0,5	-	6	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	1	-	-	7	2
10	2	2	2	2	2	2	2	2	1	-	-	7	2
12	2	2	2	2	2	2	1	1	0,5	-	-	9	3
20	2	2	2	2	2	2	1	1	0,5	-	-	9	3
15	2	2	2	2	2	1	1	1	0,5	-	-	11	2
16	2	2	2	2	2	1	1	1	0,5	-	-	11	2
19	2	2	2	2	2	1	1	1	0,5	-	-	11	2
11	2	2	2	2	2	1	0,5	0,5	0,5	-	-	14	2
13	2	2	2	2	2	1	0,5	0,5	0,5	-	-	14	3
17	2	2	2	2	2	1	1	0,5	-	-	-	16	2
21	2	2	2	2	2	1	1	0,5	-	-	-	16	1
14	2	2	2	2	1	1	0,5	0,5	-	-	-	18	3
5	2	2	1	1	1	1	0,5	0,5	-	-	-	19	2
1	2	2	1	1	1	1	0,5	-	-	-	-	20	2
18	2	2	1	1	1	0,5	0,5	-	-	-	-	21	2
6	2	1	1	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	22	3
25	2	2	1	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	23	0
28	2	1	1	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	24	2
26	2	2	1	0,5	-	-	-	-	-	-	-	25	1
27	2	1	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	26	0
32	2	1	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	26	1
30	2	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	0
WT	2	1	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tab. 3-8: Zusammenstellung der Ergebnisse aus Retransformation und Wachstumstest der Genbankklone. Zur Überprüfung der Stärke der AT-Resistenz wurde mit dem pMELβ2 enthaltenden Ausgangsstamm W303-1A VPA-HIS3 (WT) und den Genbankklonen ein Wachstumstest durchgeführt. Die Stämme wurden dazu auf MMA-Ura-/His-/Leu-Platten mit unterschiedlichen AT-Konzentrationen (0-100 mM AT) ausgebracht und deren Wachstum nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C dokumentiert. 2 = sehr gutes Wachstum, 1 = gutes Wachstum und 0,5 = schwaches bis sehr schwaches Wachstum. Die Rangfolge der Klone wurde aufgrund der Stärke ihrer AT-Resistenz festgelegt. Die Güte der Retransformation wurde wie folgt eingestuft: 3 = Retransformanten schon nach 48 h Inkubation bei 30 °C sichtbar; 2 = nach 5 Tagen Inkubation Retransformanten vorhanden; 1 = nach 5 Tagen nur wenige Klone sichtbar; 0 = keine erfolgreiche Retransformation. fett gedruckt = die Plasmide aus diesen Klonen wurden sequenziert. Die Sortierung der Klone erfolgte nach der AT-Rangfolge.

Hierbei zeigte sich, dass viele der Genbankklone auf Platten mit höheren AT-Konzentrationen als 20 mM wachsen konnten. Bei den Klonen mit den Plasmiden 6, 25 und 28 bzw. 26, 27, 30 und 32 war jedoch bei 20 mM AT kaum oder kein Wachstum vorhanden. Bis auf die Klone 6 und 28 schnitten diese auch beim Retransformationstest schlecht ab (Tab. 3-8).

Auf der Grundlage der Ergebnisse aus Retransformations- und AT-Wachstumstest wurden 19 Genbankplasmide zur Sequenzierung ausgewählt. Darunter waren alle 10 Plasmide, die bei der Retransformation ein sehr gutes Ergebnis erzielt hatten (Wachstum der Transformanten schon nach zwei Tagen) und die 9 besten aus dem AT-Wachstumstest, die nach 5 Tagen Inkubation Retransformanten gezeigt hatten. Die sich auf den Plasmiden befindende genomische Hefe-DNA mit den jeweiligen Genen bzw. Genstücken ist in Tab. 3-9 aufgeführt.

Plasmid	genomische DNA	Gene	Überlappung
2	XV 165160-166459 (1299 bp)	C-term. <i>PHM7</i> ; ½ <i>YOL083W</i>	
3	XV 771743-770679 (1064 bp)	⅔ <i>WTM1</i>	
4	XI 617888-616654 (1234 bp)	C-term. <i>PTR2</i> ; C-term. <i>RPL40B</i>	
5	XV 343749-340374 (3375 bp)	<i>YOLCdelta9</i> ; <i>SLG1</i> ; <i>YOR008C-A</i>	
6	V 290625-293901 (3276 bp)	C-term. <i>YER066W</i> ; <i>YER066C-A</i> ; <i>YER067W</i> ; ½ <i>MOT2</i>	
7	XIII 21545-22210 (665 bp)	C-term. <i>YML125C</i> ; N-term. <i>TUB3</i>	
8	XIII 40015-36370 (3645 bp)	½ <i>NAB6</i> ; <i>YML116W-A</i> ; <i>ATRI</i>	Plasmid 23
9	XV 402133-400069 (2064 bp)	½ <i>SHE4</i> ; <i>PEP12</i> ; ½ <i>CYC2</i>	
10	Transposon?		
11	VIII 394029-397393 (3364 bp)	N-term. <i>IMP3</i> ; <i>YHR149C</i> ; C-term. <i>REX28</i>	
12	X 244462-245697 (1235 bp)	C-term. <i>SAP185</i> ; ½ <i>YJL097W</i>	
13	XII 415337-417232 (1895 bp)	C-term. <i>SLX4</i> ; <i>TIS11</i> ; N-term. <i>YLR137W</i>	
14			
15	IV 167683-164643 (3040 bp)	½ <i>ODC36</i> ; <i>CDC9</i> ; <i>YDL163W</i> ; ¾ <i>YDL162C</i>	
16	XII 19689-16051 (3638 bp)	N-term. <i>AYT1</i> ; <i>MHT1</i> ; ¾ <i>MMP1</i>	
17			
19	XV 355937-(356559)	N-term. <i>YOR012W</i>	
20	XVI 146127-147380 (1253 bp)	½ <i>YPL216W</i>	
23	XIII 40456-36370 (4086 bp)	½ <i>NAB6</i> ; <i>YML116W-A</i> ; <i>ATRI</i> ; N-term. <i>Van1</i>	Plasmid 8

Tab. 3-9: Sequenzierung der Genbankklone. Die auf den Genbankplasmiden enthaltene genomische DNA wurde mit Hilfe der Sequenzierungsprimer JST 83 (bindet 5' der MCS von YEp352) und JST 84 (bindet 3' der MCS von YEp352) auf beiden Seiten der Inserts ansequenziert. Mittels *S. cerevisiae* WU-BLAST2-Suche (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>) wurden die Sequenzstücke identifiziert und genomisch zugeordnet. Durch die erhaltenen Randsequenzen ergab sich bei den meisten Plasmiden die gesamte Insertsequenz (genomische DNA). Die auf den jeweiligen DNA-Stücken enthaltenen Gene sind aufgelistet (Gene), wobei vollständig vorhandene Gene fett gedruckt sind. Den Plasmiden 10, 14, 17 und 19 konnte kein eindeutiges DNA-Stück zugeordnet werden.

Auf den Genbankplasmiden waren oft nur kleine Abschnitte der genomischen DNA (Ø ~2300 bp) und außerdem oft nur Teilbereiche von Genen bzw. ORFs vorhanden. Die vollständig enthaltenen

Gene/ORFs und ihre Charakterisierung aus der SGD-Datenbank (<http://www.yeastgenome.org/>) sind in Tab. 3-10 zusammengestellt.

Plasmid	Gen	Beschreibung
5	<i>YOLCdelta9</i>	lange terminale Wiederholung; Ty1 LTR
	<i>SLG1</i>	Sensorsignalüberträger des stress-aktivierten PKC1-MPK1 Kinase-Signalwegs, involviert in der Erhaltung der Zellwandstabilität und der Organisation des Aktincytoskeletts
	<i>YOR008C-A</i>	nicht charakterisiert
6	<i>YER066C-A</i>	nicht charakterisiert, ORF zweifelhaft
	<i>YER067W</i>	nicht charakterisiert; Lokalisation des GFP-Fusionsproteins im Cytoplasma und im Zellkern, nicht essentiell
8; 23	<i>YML116W-A</i>	nicht charakterisiert, ORF zweifelhaft
	<i>ATR1</i>	„Multidrug efflux“-Pumpe der „major facilitator superfamily“; vermittelt Resistenzen zu Aminotriazol und 4-Nitroquinolin-N-Oxid
9	<i>PEP12</i>	Membranrezeptor (t-SNARE) für vesiculäre Intermediate, die sich zwischen Golgi-Apparat und Vacuole befinden; C-terminale TMD
11	<i>YHR149C</i>	Protein unbekannter Funktion; Skg6p interagiert mit Zds1p und Zds2p
13	<i>TIS11</i>	mRNA-Bindeprotein; verstärkte Expression bei Eisenmangel; bindet an ein Sequenzelement in den 3'-Regionen bestimmter mRNAs, um deren Abbau zu vermitteln, Protein des Eisenmetabolismus; Zinkfingerprotein
15	<i>CDC9</i>	DNA-Ligase im Zellkern und den Mitochondrien
	<i>YDL163W</i>	nicht charakterisiert; ORF zweifelhaft
16	<i>MHT1</i>	S-Methylmethioninhomocysteinmethyltransferase; bewirkt mit Sam4p die Umsetzung von S-Adenosylmethionin zu Methionin

Tab. 3-10: Beschreibung der auf den Genbankplasmiden vollständig enthaltenen Gene bzw. ORFs. Die Informationen über die Gene sind der *Saccharomyces* Genomdatenbank (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) entnommen.

Hervorzuheben ist, dass zwei fast identische Plasmide, die Plasmide 8 und 23, gefunden wurden, welche beide neben einem bislang nicht charakterisierten und nicht bestätigten ORF das *ATR1*-Gen trugen. Dieses Gen codiert für Atr1p, eine „multidrug efflux“-Pumpe der „major facilitator-superfamily“, die u.a. eine Resistenz gegen Aminotriazol vermittelt [Kanazawa *et al.*, 1988; Gompel-Klein und Brendel, 1990; Goffeau *et al.*, 1997]. Da die Selektion der Genbankklone auf Platten mit 20 mM AT durchgeführt wurde, war zu erwarten, dass auch Klone mit *ATR1*-tragenden Plasmiden gewachsen sind. Wie schon aus den Restriktions- und PCR-Tests vermutet, wurden keine Plasmide, die *HIS3* trugen, sequenziert.

Bezüglich des eigentlichen Ziels, der Aufklärung der Biotinsignalkette, war *TIS11* (Plasmid 13) interessant. Tis11p ist ein Zinkfinger-mRNA-Bindeprotein, das bei Eisenmangel stimuliert wird. Es vermittelt den Abbau bestimmter mRNAs, die häufig für Proteine aus eisenabhängigen Prozessen codieren, durch die Bindung an AU-reiche Sequenzelemente (AREs für „AU-rich element“) in den 3'-UTR (englisch: „untranslated regions“-)Regionen [Thompson *et al.*, 1996;

Puig *et al.*, 2005; Vergara und Thiele, 2008]. Obwohl Tis11p als Regulator im Eisenmetabolismus wirkt, ist eine Funktion als Signalüberträger in der Biotinwahrnehmung nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde versucht nachzuweisen, dass Tis11p eine Rolle im Biotinsystem spielt. Zunächst wurde geprüft, ob die Induktion der Biotingene bei Biotinmangel bei einem *tis11Δ*-Deletionsstamm verändert ist. Bei den Biotinaufnahmetests konnten aber nach Anzucht in Normal- und Niedrig-Biotinmedium keine signifikanten Unterschiede zwischen W303-1A *tis11Δ* und dem WT-Stamm gezeigt werden (Abb. 3-40). Die Biotinaufnahme und somit die Expression des Vht1p-Biotintransporters waren bei Niedrig-Biotinbedingungen beim WT-Stamm etwa 8,5x und bei *tis11Δ* etwa 9,2x induziert, wobei die absoluten Aufnahmezeiten bei der Mutante jeweils leicht verringert waren.

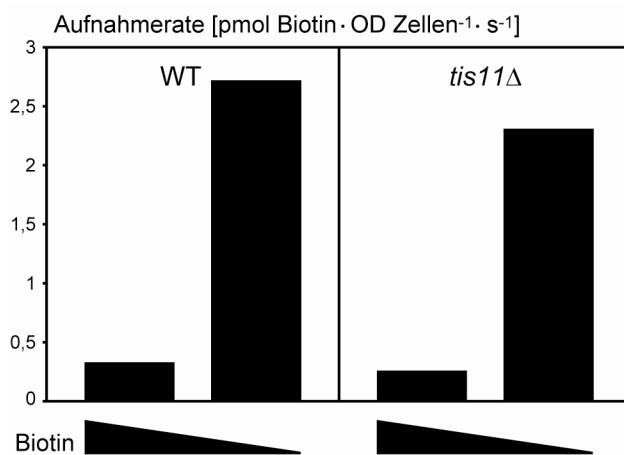


Abb. 3-40: ^{14}C -Biotinaufnahmetest mit W303-1A *tis11Δ*. Mit W303-1A (WT)- und *tis11Δ*-Zellen wurden ^{14}C -Biotin-Aufnahmetests durchgeführt. Dazu wurden die Stämme schon über Nacht in Normal (2 μg/l Biotin)- und Niedrig (0,2 μg/l Biotin)-Biotinmedium aufgeteilt und vor dem Test für 6 h in neuem Medium bis zu einer OD_{600} von etwa 1 angezogen. Es erfolgte jeweils eine Einfachbestimmung der Werte.

Außerdem wurde die Biotinaufnahme des Genbankklons 13 mit der des Ausgangsstammes bei Normal-Biotinbedingungen verglichen. Auch hier, also bei Überexpression von *TIS11*, sind die Unterschiede nicht gravierend. W303-1A VPA-*HIS3* mit Genbankplasmid 13 (Genbankklon 13) zeigte eine Aufnahmezeit von 0,25 pmol Biotin·OD Zellen⁻¹·s⁻¹, die Stämme mit pMELβ2 (*CEN*-Plasmid) bzw. YEplac195 (2 μ-Plasmid) als neutralen Plasmiden 0,36 pmol Biotin·OD Zellen⁻¹·s⁻¹ bzw. 0,42 pmol Biotin·OD Zellen⁻¹·s⁻¹. Bei diesem Test wurden zusätzlich die meisten der anderen Genbankklone, deren Plasmide sequenziert wurden, vermessen (Klone 2 bis 12, 15 bis 17, 20 und 23). Hier lagen die Aufnahmezeiten zwischen 0,23 und 0,6 pmol Biotin·OD Zellen⁻¹·s⁻¹ und waren damit auch nur leicht verringert bzw. erhöht im Vergleich zu den Stämmen mit neutralen Plasmiden.

Somit konnte bislang bei keinem der analysierten Genbankklone ein signifikanter Einfluß auf das Biotinsystem nachgewiesen werden. Um eine direkte Beteiligung der auf den Plasmiden

enthaltenen Gene in der Biotinwahrnehmung sicher auszuschließen, sollten die Tests jedoch nochmals wiederholt bzw. auch die restlichen Genbankklone mit verschiedenen Verfahren näher charakterisiert werden.

In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung von Tis11p bei der Biotinmangelantwort nicht gezeigt werden. Trotzdem bestehen überraschende Verknüpfungen zwischen Eisen- und Biotinmetabolismus. So wird bei Eisenmangel die Expression von *BIO2*, *BIO3* und *BIO4* reduziert und die von *BIO5* und *VHT1* Aftp-abhängig induziert [Rutherford *et al.*, 2003; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005; Mühlenhoff *et al.*, 2007].

Da die *BIO2* mRNA im 3'-UTR-Bereich AU-reiche RNA-Sequenzen besitzt und ähnliche Sequenzen von Tis11p gebunden werden, stellte sich die Frage, ob die eisenabhängige Regulation von *BIO2* durch Tis11p stattfindet. WT- und *tis11Δ*-Zellen wurden in Medium mit hohen (Zusatz von 300 μ M Ammoniumeisen(II)sulfat in Minimalmedium), normalen und niedrigen Eisenkonzentrationen (Zusatz eines Fe(II)-Chelators: 100 μ M BPS) angezogen und mittels Western Blot analysiert (Abb. 3-41). Die Standardisenekonzentration im Minimalmedium betrug 7,4 μ M.

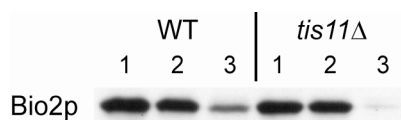


Abb. 3-41: *BIO2*-Expression von WT- und *tis11Δ*-Zellen bei Eisenmangel. Für die Western Blot-Analyse wurden BY4742 (WT)- und BY4742 *tis11Δ* (*tis11Δ*)-Zellen UN bei hohen (1), normalen (2) und niedrigen (3) Eisenkonzentrationen angezogen. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,9 bis 1,3 geerntet und je 5 OD zur Gewinnung des Gesamtzellextraktes eingesetzt. Die Blots wurden mit anti-Bio2p-Serum dekoriert. (1): Minimalmedium + 300 μ M Ammoniumeisen(II)sulfat; (2): Minimalmedium; (3): Minimalmedium + 100 μ M BPS

Die Expression von *BIO2* war in Hoch- und Normal-Eisenmedium bei beiden Stämmen fast identisch (Abb. 3-41). Wie erwartet, war die *BIO2*-Expression bei Eisenmangel in WT-Zellen reprimiert. Da beim *tis11Δ*-Stamm die Repression von *BIO2* bei Eisenmangel sogar noch stärker war, ist Tis11p für die Reduktion der *BIO2*-Expression bei Niedrig-Eisenbedingungen nicht nötig.

Um zu überprüfen, ob die BRE-Sequenz eine Bedeutung bei der eisenabhängigen Regulation von *VHT1* hat, wurden Hefen mit *VHT1*(w/o BRE)-*lacZ* als Reporterplasmid bei Hoch- und Niedrig-Eisenbedingungen angezogen und β -Galaktosidasetests durchgeführt (Abb. 3-42). Als Referenz wurden Hefen mit den Reporterplasmiden *VHT1-lacZ* und *VHT1*(w/o Aft1)-*lacZ* eingesetzt.

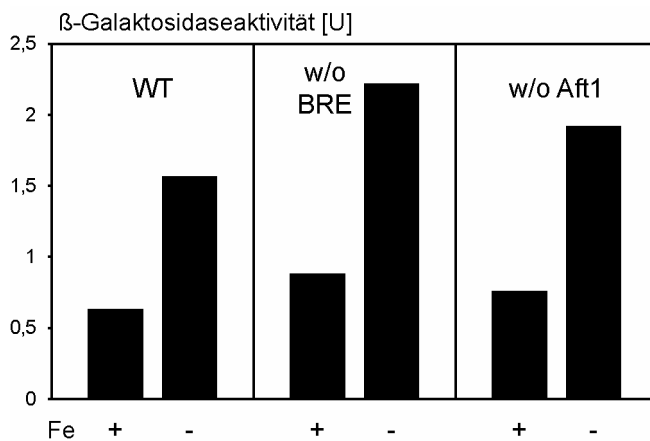


Abb. 3-42: BRE-Sequenz und Aft1-Bindestelle im *VHT1*-Promotor sind für eine eisenabhängige Expression von *VHT1* nicht essentiell. Für β -Galaktosidase-Aktivitätstests wurden W303-1A-Hefezellen mit dem unmodifizierten Reporterplasmid *VHT1-lacZ* (WT) oder mit modifizierten Plasmiden, bei denen die BRE-Sequenz (w/o BRE) bzw. die Bindestelle für Aftp (w/o Aft1) zerstört waren, eingesetzt. Wie angedeutet, wurden die Zellen dazu ÜN in Minimalmedium mit 300 μ M Ammonium Eisen(II)sulfat (+) bzw. 100 μ M BPS (-) und vor dem Test für 6 h in neuem Medium angezogen. Es erfolgte jeweils eine Einfachbestimmung der Werte.

Durch diese Reportertests wurde bestätigt, dass der *VHT1*-Promotor bei Eisenmangel stimuliert wird (Abb. 3-42). Die Stimulation wurde durch das Fehlen der BRE-Sequenz nicht beeinträchtigt. Überraschend war, dass auch die Aft1p-Bindestelle dafür nicht essentiell war, obwohl *VHT1* nach Shakoury-Elizeh *et al.* [2004] bei Eisenmangel durch Aft1p induziert wird.

Schließlich wurde überprüft, ob die Biotinmangel-bedingte Induktion von *VHT1* und *BIO2* durch Eisenmangel beeinflusst wird. Dazu wurden WT-Zellen mit *VHT1-lacZ* bzw. pMEL β 2-Fragment A als Reporterplasmid für β -Galaktosidasetests (Abb. 3-43A und B) und Western Blot-Analysen (Abb. 3-43C) in Hoch- und Niedrig-Eisenmedien jeweils mit Normal- bzw. Niedrig-Biotingehalt aufgeteilt. Daneben wurde kontrolliert, ob bei Eisenmangel die Proteinbiotinylierung verändert ist (Abb. 3-43D).

War ausreichend Eisen vorhanden, wurde der *VHT1*-Promotor durch Biotinmangel 6,4x stimuliert (Abb. 3-43A). Dies entspricht etwa der biotinabhängigen *VHT1*-Promotorregulation bei Anzucht der Zellen unter Standardbedingungen (Minimalmedium ohne Zusatz; vgl. Abb. 3-3). Bei Eisenmangel war die Grundexpression des Reportergens leicht erhöht, konnte aber durch zusätzlichen Biotinmangel nicht viel weiter gesteigert werden. Bei den Tests mit pMEL β 2-Fragment A (Plasmid trägt das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle eines BRE-enthaltenden 134 bp langen *VHT1*-Promotorstücks; vgl. Abb. 3-6) als Reporterplasmid waren die Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrig-Eisenbedingungen noch deutlicher (Abb. 3-43B). Hier blieb bei Eisenmangel eine biotinabhängige Aktivierung des *VHT1*-Promotorstücks vollständig aus. Auch bei *BIO2* war die biotinabhängige Regulation bei Eisenmangel gestört (Abb. 3-43C). Die verringerte *BIO2*-Expression nach Anzucht der Zellen in Niedrig-Eisenmedium gegenüber Hoch-Eisenmedium wurde durch einen Mangel an Biotin nicht verändert. Bei hohen

Eisenkonzentrationen dagegen zeigte sich in der Western Blot-Analyse die bekannte Stimulation der *BIO2*-Expression durch Biotinmangel. Die Biotinylierung der Biotinproteine wurde durch die Eisenkonzentration im Medium nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 3-43D).

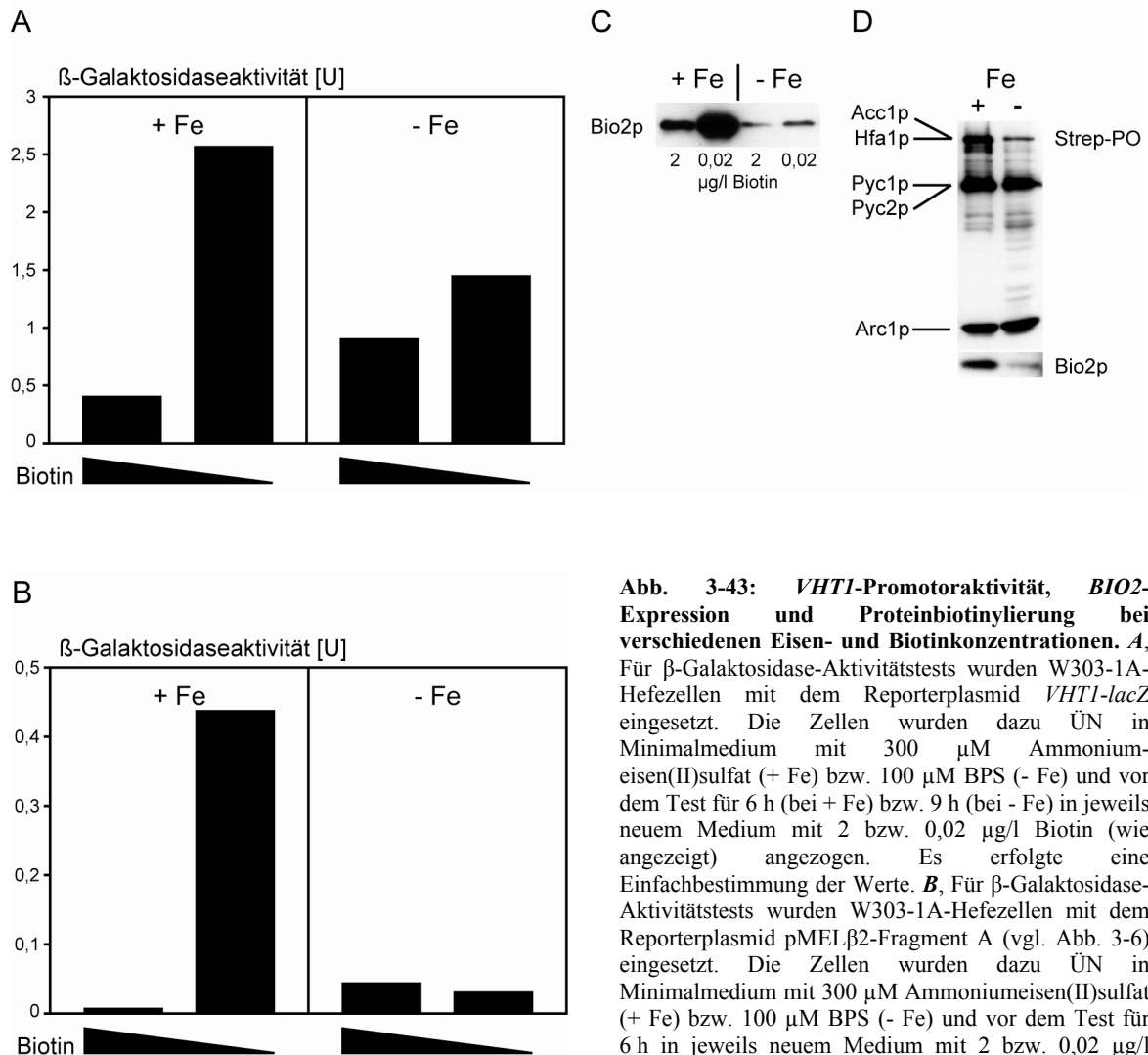


Abb. 3-43: *VHT1*-Promotoraktivität, *BIO2*-Expression und Proteinbiotinylierung bei verschiedenen Eisen- und Biotinkonzentrationen. **A**, Für β-Galaktosidase-Aktivitätstests wurden W303-1A-Hefezellen mit dem Reporterplasmid *VHT1-lacZ* eingesetzt. Die Zellen wurden dazu ÜN in Minimalmedium mit 300 µM Ammonium-eisen(II)sulfat (+ Fe) bzw. 100 µM BPS (- Fe) und vor dem Test für 6 h (bei + Fe) bzw. 9 h (bei - Fe) in jeweils neuem Medium mit 2 bzw. 0,02 µg/l Biotin (wie angezeigt) angezogen. Es erfolgte eine Einfachbestimmung der Werte. **B**, Für β-Galaktosidase-Aktivitätstests wurden W303-1A-Hefezellen mit dem Reporterplasmid pMELβ2-Fragment A (vgl. Abb. 3-6) eingesetzt. Die Zellen wurden dazu ÜN in Minimalmedium mit 300 µM Ammonium-eisen(II)sulfat (+ Fe) bzw. 100 µM BPS (- Fe) und vor dem Test für 6 h in jeweils neuem Medium mit 2 bzw. 0,02 µg/l Biotin (wie angezeigt) angezogen. Es erfolgte eine Einfachbestimmung der Werte. **C**, Proteinextrakte aus

(A) wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Der Blot wurde mit anti-Bio2p-Serum dekoriert. **D**, Für die Western Blot-Analyse wurden W303-1A *VHT1-lacZ*-Zellen ÜN in Minimalmedium mit 300 µM Ammonium-eisen(II)sulfat (+ Fe) bzw. 100 µM BPS (- Fe) und vor dem Test für 6 bis 8 h in jeweils neuem Medium angezogen. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1 geerntet und je 5 OD zu Gewinnung des Gesamtzellextraktes eingesetzt. Die Blots wurden wie angezeigt mit anti-Bio2p-Serum (Kontrolle) oder zur Detektion der biotintragenden Proteine mit Strep-PO dekoriert.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass bei Eisenmangel die Biotinmangelantwort verringert ist oder ausbleibt. Allerdings muss man beachten, dass sich die Zellen bei Eisenmangel nach der Auftrennung in Normal- und Niedrig-Biotinmedium jeweils nur noch einmal geteilt hatten. Bei

ausreichendem Eisenangebot teilen sich die Zellen in diesem Zeitraum zwei- bis dreimal. Dies zeigt, dass Eisenmangel eine große physiologische Belastung darstellt, die vermutlich zu einer allgemein reduzierten Genexpression führt. Wie spezifisch die beobachteten Effekte sind, muss in weiteren Experimenten abgeklärt werden.

4 Diskussion

Saccharomyces cerevisiae ist in der Lage eine Vielzahl von Nährstoffen in der Umgebung zu identifizieren, deren Konzentration zu bestimmen und durch eine Anpassung der Genexpression, des Metabolismus und des Zellwachstums auf diese Nährstoffauswahl zu reagieren [Holsbeeks *et al.*, 2004; Sellick und Reece, 2005; Carman und Han, 2007; Dechant und Peter, 2008; Xue *et al.*, 2008; Ljungdahl, 2009]. Auch das Vitamin Biotin gehört zu diesen Nährstoffen. Bislang war allerdings nur bekannt, dass Hefe bei einem Mangel an Biotin die Expression des Biotintransportergens *VHT1* steigert [Rogers und Lichstein, 1969a; Stolz *et al.*, 1999].

Diese Arbeit gibt nun erstmals einen Einblick in die Wahrnehmung von Biotin und die Regulation biotinrelevanter Gene in *S. cerevisiae*. Mittels Western Blot- und Reporteranalysen und den Daten aus Mikro-Array- und Northern Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass neben *VHT1* auch die restlichen Gene des Biotinmetabolismus in *S. cerevisiae* durch Biotin reguliert werden. Außerdem wurden sowohl ein neues DNA-Element, welches als „upstream activating sequence“ (UAS) die Biotinmangelantwort übermittelt, als auch Proteine, die bei der Wahrnehmung von Biotin eine Rolle spielen, identifiziert.

4.1 Die Aktivierung der Biotingene erfolgt über das BRE-Promotorelement

Nach Kellis *et al.* [2003] ist für die direkte Identifikation von regulatorischen Elementen das Suchen von gemeinsamen Sequenzmotiven in der Nähe von funktionell verwandten Genen die bislang erfolgversprechendste Vorgehensweise. In ihrer Arbeit untersuchten die Autoren zeitgleich mit der Gruppe um Mark Johnston [Cliften P. *et al.*, 2003] die Methode der vergleichenden Genomanalyse in *S. cerevisiae* auf der Basis der phylogentischen Konservierung.

Durch Kombination beider Herangehensweisen, wie es prinzipiell z.B. auch von Wang T. und Stormo [2003] vorgeschlagen wurde, konnte in dieser Arbeit in den Promotorregionen der Gene des Biotinmetabolismus in *S. cerevisiae* ein neues DNA-Element, die BRE-Sequenz, identifiziert werden (vgl. Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.2.1). Die BRE-Sequenz ist innerhalb der *VHT1*-Promotorsequenzen der nah verwandten Hefe-Spezies an fast allen Positionen stark konserviert (Konsensussequenz innerhalb der *VHT1*-Promotoren: GAATCAYNTYRGRATGAYTY). Betrachtet man aber die Konsensussequenz aus dem Sequenzvergleich der *VHT1*-, *BIO2*- und *BPL1*-Promotoren (allgemeine Konsensussequenz: (T/G)ARTCA-N₈-TGAYTN; die Buchstaben A, G, T und C besetzen Positionen mit einem Konservierungsgrad von über 90 %), so treten stark konservierte, palindromische Randsequenzen hervor, die die mittleren acht Nukleotide

umschließen. Palindromische Sequenzen sind oft Bestandteil von Transkriptionsfaktorbindestellen, und insbesondere gibt es auch Beispiele von Hefetranskriptionsfaktoren, deren Bindeplattformen einen zur BRE-Sequenz vergleichbaren Aufbau zeigen (z.B. Transkriptionsfaktoren aus der binuklearen Zn-Cluster-Familie [Todd und Andrianopoulos, 1997] wie Put3p aus dem Prolinmetabolismus mit der Bindesequenz CGG-N₁₀-CCG [Siddiqui und Brandriss, 1989] oder Gal4p aus dem Galaktosemetabolismus mit CGG-N₁₁-CCG [Marmorstein *et al.*, 1992]). Somit wird hier postuliert, dass die BRE-Sequenz, die keine Ähnlichkeit zu der 40 bp Operatorbindestelle des *E. coli* Biotinoperons zeigt [Otsuka A. und Abelson, 1978], die Transkriptionsfaktorbindestelle für den Regulator des Biotinmetabolismus in *S. cerevisiae* ist.

Durch Promotor-Reporter-Gen-Analysen mit den Promotoren von *VHT1* und *BIO2* konnte auch experimentell gezeigt werden, dass diese *cis*-Regulatorsequenz nötig (vgl. Abb. 3-3, Abb. 3-6, Abb. 3-7) und hinreichend (vgl. Abb. 3-6) für eine biotinabhängige Expressionsregulation ist und damit als UAS für Biotin (UAS_{BIO}) die Biotinmangelantwort übermittelt. Außerdem wurden UAS_{BIO}-Sequenzen auch in den Promotoren der restlichen Gene des Biotinmetabolismus gefunden und deren biotinabhängige Expression bestätigt (vgl. Kapitel 3.1.2).

Im Gegensatz zu dem Biotinregulationssystem in *E. coli*, bei dem die Operatorsequenz des Biotinoperons eine Repressorbindestelle darstellt (vgl. Kapitel 1.2.7), ist die UAS_{BIO} in Hefe vielmehr eine Aktivatorbindestelle, was typisch ist für eukaryotische Regulatorsequenzen. Denn bei Promotor-Reporter-Gen-Analysen zeigten Reporterplasmide mit deletierten UAS_{BIO}-Sequenzen in Normal-Biotin keine Auffälligkeiten, wohingegen die Aktivierung des Systems durch Niedrig-Biotinbedingungen ohne UAS_{BIO} nicht mehr möglich war (vgl. Kapitel 3.1.1.2 bis 3.1.1.4). Obwohl es nicht ausgeschlossen ist, dass der inaktive Transkriptionsfaktor auch bei hohen Biotinkonzentrationen bindet, scheint die UAS_{BIO} nur bei Niedrig-Biotinbedingungen oder zumindest von keinem bislang bekannten Transkriptionsfaktor besetzt zu sein. Darauf deuten frühere genomweite Analysen mit Zellen aus Vollmedium hin, bei denen die UAS_{BIO} nicht erkannt wurde [Harbison *et al.*, 2004; MacIsaac *et al.*, 2006].

Zeitgleich mit Daten aus dieser Arbeit [Pirner und Stolz, 2006] wurden die Analysen über die biotinabhängige Regulation in *S. cerevisiae* von Weider *et al.* [Weider, 2006; Weider *et al.*, 2006] veröffentlicht. Durch Deletions- und Mutationsanalysen des *VHT1*-Promotors und durch *in silico* Sequenzvergleich der Promotorregionen von *VHT1* und *BIO5* nah verwandter *Saccharomyces*-Spezies und *Ermothecium gossypii* (Ordnung Saccharomycetales) wurde dort ebenfalls eine Biotin-Regulationssequenz entdeckt und VHRE („vitamin H-responsive element“) genannt. Die bei Weider *et al.* [2006] vorgestellte Konsensussequenz hat zwar nur eine Länge von 18 bp, stimmt aber ansonsten mit der BRE-Sequenz überein (VHRE-Sequenz: AATCA-N₈-TGAYN). Besonders betont werden von den Autoren auch der palindromische Charakter der Sequenz und die essentielle Funktion der zwei A-Nukleotide am 5'-Ende der Sequenz.

Neben der neu entdeckten UAS_{BIO} enthält der *VHT1*-Promotor aber auch eine Transkriptionsfaktorbindestelle für Gcn4p (UAS_{GCRE}). Gcn4p wirkt als Aktivator in der Aminosäurebiosynthese, reguliert aber bei Aminosäuremangel und diversen anderen Stressbedingungen auch die Expression vieler weiterer Gene [Natarajan *et al.*, 2001; Hinnebusch und Natarajan, 2002]. Wenn bei Aminosäuremangel Intermediate aus dem Krebszyklus entommen werden, wird bei Wachstum auf Glukose die Funktionalität des Zyklus nur durch die anaplerotische Reaktion der biotinabhängigen Pyruvatcarboxylasen, welche Pyruvat zu Oxalacetat carboxylieren, aufrechterhalten [Stucka *et al.*, 1991]. Ein Auffüllen des Oxalacetatreservoirs über den Glyoxylatzyklus [Duntze *et al.*, 1969; Hagele *et al.*, 1978] ist nicht möglich, da Glukose die Enzyme des Glyoxylatzyklus reprimiert [Gancedo, 1992]. Im Gegensatz zu früheren Vermutungen [Natarajan *et al.*, 2001] scheint also eine Stimulation der Biotinaufnahme und somit bessere Verfügbarkeit von Biotin für eine Steigerung der Pyruvatcarboxylaseaktivität sinnvoll zu sein. Des Weiteren stehen beide Pyruvatcarboxylasegene unter der Kontrolle von Gcn4p [Natarajan *et al.*, 2001]. Obwohl die UAS_{BIO} einer UAS_{GCRE} ähnlich ist, wird die Expression von *VHT1* bei Histidinmangel nur durch das Entfernen der Gcn4p-Bindestelle und nicht durch das der UAS_{BIO} herabgesetzt. Umgekehrt beeinflusst die Deletion der UAS_{BIO}, nicht aber die der UAS_{GCRE}, die Steigerung der *VHT1*-Expression bei Biotinmangel (vgl. Kapitel 3.1.1.2). Beides zusammen impliziert, dass ein Mangel an Biotin und ein Mangel an Aminosäuren unterschiedliche physiologische Signale darstellen.

Ferner zeigen nach Weider [2006] *gcn4Δ*-Mutanten keine Veränderung der biotinabhängigen Expression eines *VHT1*-Promotor-Reportergens, womit gleichzeitig eine indirekte Steuerung von *VHT1* durch Gcn4p über andere Transkriptionsfaktoren, welche auch Gcn4p-Ziele sein können [Natarajan *et al.*, 2001], ausgeschlossen wird.

Außerdem werden zwar neben *VHT1* auch die biotinabhängig regulierten Gene *BIO3*, *BIO4* (ohne Gcn4p-Bindestelle in der Promotorregion) und *BIO5* von Gcn4p beeinflusst, nicht aber *BIO2*, obwohl *BIO2* eine UAS_{GCRE} besitzt [Natarajan *et al.*, 2001]. Schließlich kann noch angeführt werden, dass weder das Gen für Gcn4p noch die Gcn4p-regulierten Gene *PYC1* und *PYC2* durch Biotinmangel induziert werden (vgl. Abb. 3-8 und 3-11).

Ein weiteres Promotorelement von *VHT1* ist die Aft1p-Bindestelle. Aft1p, ein bedeutender eisenabhängiger Transkriptionsfaktor in Hefe [Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995], aktiviert die Expression von *VHT1* [Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004]. Da niedrige Eisenbedingungen nicht nur die Expression vieler eisennutzender Proteine, wie auch die der zwei Fe/S-Cluster enthaltenden Biotinsynthase Bio2p, herabsetzen, sondern auch die Expression der anderen Biotinbiosynthesegene *BIO3* und *BIO4* reduzieren, könnte Biotin unter Eisenmangel nicht mehr synthetisiert werden [Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund dient die Aft1p-abhängige

Steigerung des Biotinimports vermutlich der Erhaltung des Biotinstatus bei Eisenmangel. Hefen haben jedoch unter Laborbedingungen im synthetischen Minimalmedium normalerweise keine Biotinvorläufer für die Synthese von Biotin zur Verfügung und außerdem besitzt eine Deletion des *BIO2*-Gens keinen direkten Einfluß auf die *VHT1*-Expression (vgl. Abb. 3-16). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Aft1p-Bindestelle allerdings nicht zu der Übertragung der Biotinmangelantwort auf *VHT1* nötig (vgl. Kapitel 3.1.1.2 und 3.1.1.3). Zusätzlich sprechen die fehlende Konservierung der Aft1p-Bindestelle in den *VHT1*-Promotoren der nah verwandten *Saccharomyces*-Stämme und die bei Eisenmangel reziproke Regulation von Biotinaufnahme und Biotinbiosynthese gegen eine Beteiligung von Aft1p in der Biotinsignalkette.

Der *VHT1*-Promotor enthält zudem eine Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren Ino2p/Ino4p, welche als heterodimere Aktivatoren bei einem Mangel an Inositol und Cholin (IC) unter anderem in der Regulation des Phospholipidmetabolismus eine große Rolle spielen [Schüller *et al.*, 1995]. So wird auch die Acc1p, verantwortlich für den ersten Schritt der Fettsäurebiosynthese, durch das Vorhandensein von IC reprimiert [Hasslacher *et al.*, 1993]. Laut Santiago und Mamoun [2003] ist aber die Expression von *VHT1*, von *BPL1* und die der Biotinbiosynthesegene ebenfalls IC-abhängig reprimiert. Diese Koregulation könnte die ausreichende Versorgung der Acc1p mit Biotin gewährleisten. Andererseits zeigen aber die Daten aus Kapitel 3.1.1.2 und andere Studien [Hoppen *et al.*, 2005; Jesch *et al.*, 2005] keinen Einfluß von IC auf die *VHT1*-Expression. Da die Ino2p/Ino4p-Bindestelle des *VHT1*-Promotors zusätzlich unter den nah verwandten *Saccharomyces*-Stämmen nicht konserviert ist, spielen diese Proteine für die Expression von *VHT1* offensichtlich keine große Rolle.

In silicio wurden schließlich neben der BRE-Sequenz noch zwei weitere zur BRE verwandte Sequenzen im *S. cerevisiae* *VHT1*-Promotor (vgl. Abb. 3-1: ⁻⁴⁶³AAATCATCGTCAATTATTC⁻⁴⁴⁵ und ⁻³⁰⁵AAATCATCATTAGTTCACCC⁻²⁸⁶) gefunden, wobei die Sequenz ⁻³⁰⁵AAATCATCATTAGTTCACCC⁻²⁸⁶ auch in den nah verwandten Hefen *S. paradoxus*, *S. mikatae* und *S. bayanus* konserviert ist. Diese BRE-ähnlichen Sequenzen sind möglicherweise für die schwache biotinabhängige Regulation des *VHT1*-Promotors bei Deletion der UAS_{BIO} (vgl. Abb. 3-3) verantwortlich. Auch Weider [2006] spricht von eventuell zusätzlichen *cis*-Elementen, weist aber auch auf mögliche sekundäre Effekte durch Absinken der Konzentration von Metaboliten aufgrund Biotinmangels hin.

4.2 Die Wahrnehmung von Biotin erfolgt intrazellulär ohne die Beteiligung des Biotintransporters Vht1p

Holsbeeks *et al.* [2004] stellen in ihrem Übersichtsartikel drei verschiedene Rezeptorproteintypen in der Plasmamembran von Bäckerhefe vor, welche Nährstoffe in der Umgebung wahrnehmen und entsprechende Signalwege initiieren. Dazu gehören zum einen der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Gpr1p, ein Glukose- und Saccharose-Sensor, zum anderen Transporterhomologe, die keine detektierbare Transportaktivität besitzen, wie z.B. die Glukosesensoren Snf3p und Rgt2p oder der Aminosäuresensor Ssy1p, und schließlich aktiv transportierende Nährstoffpermeasen, wie z.B. der Ammoniumsensor Mep2p, die Aminosäurepermease Gap1p und die Phosphatpermeasen Pho84p und Pho87p [Holsbeeks *et al.*, 2004].

In Analogie zu diesen Sensoren wäre der Biotintransporter Vht1p ein Kandidat für die Wahrnehmung der extrazellulären Biotinkonzentration. Wie schon erwähnt (vgl. Kapitel 1.2.6) ist Vht1p ein Mitglied der Allantoat-Permease-Familie [Nelissen *et al.*, 1997; Stolz, 2003]. Bei einigen Transportern dieser Familie erfolgt wie bei Vht1p die Regulation der Expression abhängig von der Substratkonzentration im Medium [Stolz *et al.*, 1999; Llorente und Dujon, 2000; Stolz, 2003; Kaur und Bachhawat, 2007]. Diese Art der Regulation wird auch beim oben aufgeführten Phosphattransporter Pho84p beobachtet, einem Phosphatsensor, der bei Phosphatmangel induziert wird und vermutlich eine Rolle in der phosphatabhängigen Aktivierung von Zielproteinen der Proteinkinase A spielt [Giots *et al.*, 2003; Holsbeeks *et al.*, 2004]. SAT2, ein Aminosäuretransporter von Säugern, wird ebenfalls bei Aminosäuremangel induziert und scheint über die Wahrnehmung des Substrats seine eigene Expression zu regulieren [Hyde *et al.*, 2003; Holsbeeks *et al.*, 2004]. Andererseits können im Gegensatz dazu auch substratunabhängige Substanzen die Expression mancher Gene der Allantoat-Permease-Familie beeinflussen [Rai *et al.*, 1987; Klebl *et al.*, 2000; Llorente und Dujon, 2000; Pirner und Stolz, 2006; Kaur und Bachhawat, 2007].

Vht1p besitzt eine lange hydrophile N-terminale Domäne von 120 Aminosäuren auf der cytoplasmatischen Seite der Membran [Stolz *et al.*, 1999], eine Eigenschaft, die an die transporterhomologen Sensoren Ssy1p, Snf3p und Rgt2p erinnert. Der N-Terminus von Ssy1p ist nämlich gegenüber den homologen Transportern um 200-300 Aminosäuren verlängert [Klasson *et al.*, 1999], die C-terminalen Domänen der Glukosesensoren Snf3p und Rgt2p um mehr als 200 Aminosäuren [Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Ozcan *et al.*, 1998]. Die verlängerten Domänen gelten dabei als essentiell für die Sensorfunktion der Proteine [Ozcan *et al.*, 1998; Klasson *et al.*, 1999].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben jedoch, dass Vht1p nicht an der Wahrnehmung von Biotin und der Induktion des Biotinsignalweges beteiligt ist, denn Biosynthesestufen von Biotin können durch interne Umwandlung in Biotin auch unabhängig von Vht1p die Expression von Zielgenen beeinflussen (vgl. Kapitel 3.2.2). Zusätzlich wird Biotinmangel in dem Stamm *vht1Δ::vht1⁺*, in dem der heterologe Biotintransporter aus *S. pombe* den *S. cerevisiae*-Transporter ersetzt, wahrgenommen (Daten nicht gezeigt). Die beiden Transporter gehören zwar beide zur Allantoat-Permease-Familie, besitzen ähnliche biochemische Eigenschaften und haben jeweils 12 Transmembrandomänen und lange hydrophile N- und C-terminale Domänen, unterscheiden sich jedoch mit 24 % identischen Aminosäuren über 219 Aminosäurereste stark in der Primärstruktur [Stolz, 2003], was eine Übertragung von regulatorischen Eigenschaften in den anderen Organismus unwahrscheinlich macht.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass die extrazelluläre Biotinkonzentration das Signal der Biotinwahrnehmung in *S. cerevisiae* ist. Obwohl *vht1Δ*-Mutanten bei sehr hohen Biotinkonzentrationen angezogen wurden, wiesen sie hohe Reporterogenaktivitäten und somit eine Aktivierung des Biotinsystems auf (vgl. Kapitel 3.2.1). Ein anderer Membransensor, der die Außenkonzentration von Biotin bestimmt, scheidet damit auch aus.

Dieselbe Schlussfolgerung, der von Vht1p unabhängigen intrazellulären Wahrnehmung von Biotin, zieht auch Weider [2006] aus weiteren Experimenten. Zum einen konnte er mittels Reporterexpressionstudien (*VHT1*-Promotor/GFP-Reporterplasmid) ebenfalls zeigen, dass *vht1Δ*-Mutanten die Expression von *VHT1* induzieren können. Zum anderen führte er *VHT1*-Promotor-GFP-Reporteranalysen mit einem *vht1Δ*-Stamm, der *AtSUC5* auf einem Überexpressionvektor trug, durch. *AtSUC5* ist ein Saccharosetransporter aus *Arabidopsis thaliana*, der auch Biotin transportiert [Ludwig *et al.*, 2000]. Der Transporter weist zu Vht1p aber nur eine Sequenzidentität von 10,4% auf und hat keine verlängerten hydrophilen Domänen [Weider, 2006]. Laut Weider [2006] ist es demnach unwahrscheinlich, dass *AtSUC5* neben dem Biotintransport eine Sensorfunktion in *S. cerevisiae* übernehmen kann. Der mit *AtSUC5* transformierte *vht1Δ*-Stamm fluoreszierte auf Niedrig-Biotinmedium, nicht aber auf Hoch-Biotinmedium. Da er damit eine WT-ähnliche Biotinwahrnehmung zeigte, schließt Weider [2006] Vht1p als Biotinsensor aus.

4.3 Die Rolle der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p bei der Biotinwahrnehmung

Im Gegensatz zum Biotintransporter Vht1p spielt die Biotin-Protein-Ligase Bpl1p eine wichtige, wenn auch vermutlich indirekte Rolle bei der Biotinmangelantwort, denn eine normale Aktivität

der Bpl1p ist essentiell für eine korrekte Biotinwahrnehmung. Ist die Aktivität der Bpl1p verringert – durch das Einführen einer Mutation oder durch Reduktion der Enzymmenge – wird auch bei normalen Biotinbedingungen das Biotinmangelsignal erzeugt (vgl. Kapitel 3.2.3).

In *E. coli* besitzt die bifunktionelle Biotin-Protein-Ligase BirA neben der Carboxylierungsaktivität eine Funktion in der Regulation des Biotinmetabolismus (vgl. Kapitel 1.2.7). Bei Biotinüberschuss oder einem Mangel an Apo-BCCP (BCCP ist das einzige Biotinakzeptorprotein in *E. coli*) akkumuliert in den Zellen die aktivierte Form von BirA, der Biotinyl-5'-AMP-BirA-Komplex, und dimerisiert. Über die N-terminale Domäne von BirA bindet dieser aktivierte Enzymkomplex an einen 40 bp Biotinoperator in der Promotorregion des Biotinbiosyntheseoperons und blockiert die Initiation der Transkription der Biotinbiosynthesegene. Häuft sich Apo-BCCP aufgrund Biotinmangels oder verstärkter BCCP-Expression an, wird Biotin auf das Apo-BCCP übertragen, der Biotinyl-5'-AMP-Enzymkomplex aufgelöst und die Operatorbindung von BirA verhindert.

Auch wenn die N-terminale Domäne der *S. cerevisiae* Bpl1p ähnlich wie bei BirA für die Aktivität des Enzyms wichtig ist, besitzt sie andererseits wie alle eukaryotischen BPLs keine DNA-Bindefunktion [Polyak *et al.*, 1999; Alban, 2000]. Außerdem wird wahrscheinlich das Biotinsystem in *S. cerevisiae*, im Gegensatz zu *E. coli*, durch einen Aktivator reguliert (vgl. Kapitel 4.1). Gegen eine direkte Rolle der Bpl1p in der Regulation der Biotingene spricht auch, dass Bpl1p aus *S. pombe* mit einer Proteinverwandtschaft zu Bpl1p aus *S. cerevisiae* von nur 33 % in einer *S. c. bpl1A*-Mutante nicht nur die Biotinylierungsfunktion übernehmen kann, sondern dieser Stamm damit auch fähig ist die Biotinmangelantwort einzuleiten (Daten nicht gezeigt).

Zellen mit reduzierter *BPLI*-Expression und aktiviertem Biotinsystem (*GAL-BPLI*-Zellen nach Anzucht in Glukose) besitzen in etwa die gleiche Konzentration an intrazellulärem freiem Biotin wie die *GAL-BPLI*-Zellen bei induzierter *BPLI*-Expression. Gegenüber WT-Zellen unter normalen Bedingungen ist diese sogar etwa 2x erhöht. Dagegen haben Zellen aus Niedrig-Biotinmedium mit induzierter Biotinmangelantwort eine geringe intrazelluläre Konzentration an freiem Biotin (vgl. Tab. 3-1, Seite 62). Somit ergibt sich kein Zusammenhang zwischen cytoplasmatischer Konzentration an freiem Biotin und dem Signal für die Expressionssteigerung der biotinabhängig regulierten Gene.

Eine Gemeinsamkeit von Zellen mit aktivierter Biotinmangelantwort (Zellen aus Niedrig-Biotinmedium, *vht1A*-Mutanten und Zellen mit reduzierter Bpl1-Aktivität) ist dagegen ihre stark verringerte Proteinbiotinylierung, die bei allen biotintragenden Proteinen auffällt.

Eine mögliche Erklärung für die Wechselbeziehung zwischen Aktivität der Bpl1p und Regulation der Expression der Biotingene ist, dass die verminderte Aktivität eines biotinabhängigen Enzyms unter Bedingungen mit reduzierter Proteinbiotinylierung das Biotinmangelsignal auslöst. Das

auslösende Signal könnte alternativ der mit reduzierter Proteinbiotinylierung einhergehende Mangel an Metaboliten sein. Beide Möglichkeiten können aber weitgehend ausgeschlossen werden, denn weder ein Absenken der Aktivität des essentiellen Enzyms Acc1p und der vermutlich damit einhergehenden Reduktion der Malonyl-CoA- und Fettsäuremenge in den Zellen noch die Deletion eines Gens der anderen biotintragenden Enzyme rufen eine erhöhte Reportergenexpression hervor (vgl. Kapitel 3.2.4). Die Zugabe von Fettsäuren zum Nährmedium verringert andererseits zwar die absolute Reportergenexpression in WT-Zellen, verhindert aber kein Biotinmangelsignal und kann auch hier mit einer Reduktion der Acc1p-Menge erklärt werden (vgl. Abb. 3-18 und 3-22). Dazu beobachtet man im Falle einer *bpl1*-Mutation trotz Fettsäurezusatz sogar unter Normal-Biotinbedingungen hohe Expressionslevel des Reportergens (vgl. Abb. 3-18).

Nach Deletion beider Pyruvatcarboxylasegene wird von *S. cerevisiae*-Zellen keine Biotinmangelantwort mehr initiiert (vgl. Abb. 3-24; Tab. 3-2, Seite 77; Abb. 3-25 und 3-26). Hier muss man zwar berücksichtigen, dass den Pyc-Doppeldeletionsmutanten zum Wachstum Aspartat zugesetzt wurde, das von den Zellen zu Oxalacetat, dem Stoffwechselprodukt der Pyruvatcarboxylasen, umgesetzt werden kann. Andererseits kann der WT-Stamm unter den gleichen Bedingungen eine normale Biotinregulation durchführen und eine Verringerung der Aspartat-Konzentration im Medium ändert nichts an dem Verlust der Biotinmangelantwort von Pyc-Doppeldeletionsmutanten (Daten nicht gezeigt).

Denkbar ist auch, dass von den Zellen der Biotinylierungsgrad eines der Biotinproteine wahrgenommen wird. Hier ist interessant, dass bei Mutanten, bei denen die Gene einzelner biotintragender Proteine deletiert bzw. herabreguliert sind, die Biotinmangelantwort noch möglich ist, wenngleich sie meist deutlich geringer ausfällt als beim WT-Stamm. Obwohl ein Sensorprotein eventuell auch mit mehreren biotintragenden Proteinen, selbst in unterschiedlichen Kompartimenten (Hfa1p ist in den Mitochondrien lokalisiert, die restlichen Biotinproteine im Cytoplasma), wechselwirken könnte, ist wohl eher die Biotinylierung der verbleibenden Biotinproteine aufgrund eines Mangels von Biotinakzeptoren über eine längere Zeit gesichert. Beispielsweise zeigt der *arc1Δ*-Stamm, der im Vergleich zum WT unter Normalbedingungen etwa eine doppelt so hohe Konzentration an freiem Biotin besitzt, zumindest im β -Galaktosidasetest, erst nach längerer Zeit in Niedrig-Biotinmedium eine normale Biotinmangelantwort (vgl. Abb. 3-25). Zudem ist es umgekehrt möglich, Reportergenaktivitäten durch die Überexpression der Biotindomäne von Pyc1p im *arc1Δ*-Stammhintergrund schon bei Normal-Biotinbedingungen zu stimulieren. Im WT-Stamm sieht man keinen Effekt, da Arc1p hier vielleicht als „Biotinpuffer“ dient (Daten nicht gezeigt).

Bei früheren Interpretationen galt es deshalb als unwahrscheinlich, dass Biotinproteine direkt an der Biotinwahrnehmung beteiligt sind [Pirner und Stolz, 2006]. In weiteren Experimenten konnte aber gezeigt werden, dass beim Fehlen beider Pyruvatcarboxylasegene auch nach längerer Inkubation unter Biotinmangel kein Biotinmangelsignal auslösbar ist (vgl. Abb. 3-25). Selbst durch das zusätzliche Entfernen des Biotintransportergens *VHT1*, was zu einem hohen internen Biotinmangel führt, kann der Hefestamm ohne die Pyruvatcarboxylasen die Expression eines biotinresponsiven Reportergens nicht steigern (vgl. Abb. 3-26). Dies deutet auf eine direkte Beteiligung der Pyc-Proteine an der Biotinwahrnehmung hin.

Eine weitere in Pirner und Stolz [2006] diskutierte Möglichkeit für die Beteiligung der Bpl1p an der Biotinmangelantwort ist die direkte Biotinylierung eines bislang unbekannten Biotinsensors, der in den Western Blots aufgrund einer zu geringen Proteinmenge jedoch nicht identifiziert werden konnte. Damit ein Biotinmangel von den Zellen wahrgenommen werden kann, bevor die Modifikation und damit die Aktivität der biotintragenden Enzyme abnimmt, müsste ein solcher Sensor eine geringe Affinität zu Bpl1p haben. Diese Eigenschaft trifft z.B. auf Arc1p, ein nicht-klassisches Biotinprotein, zu (vgl. Abb. 3-11 und [Kim H. S. *et al.*, 2004]). Allerdings kann weder Arc1p der alleinige Sensor sein, da *arc1Δ*-Mutanten immer noch eine Biotinmangelantwort auslösen können (vgl. Abb. 3-23 und 3-25), noch ist bei diesem Modell die Funktion der Pyc-Proteine in der Biotinwahrnehmung berücksichtigt. Außerdem ist der Lysinrest, der in Arc1p modifiziert wird, selbst in nahe verwandten Hefen nicht konserviert [Kim H. S. *et al.*, 2004] und nur wenige der von Jürgen Stolz und seinen Mitarbeitern untersuchten Hefespezies zeigen eine Arc1p-typische Bande (40 bis 50 kD) im mit Strep-PO dekorierten Western Blot (persönliche Mitteilung von Jürgen Stolz). Es ist allerdings bemerkenswert, dass Bpl1p auch Proteine mit einer nichtkanonischen Biotindomäne biotinylieren kann.

Wie vorher dargelegt, korreliert die Konzentration an intrazellulärem freien Biotin nicht mit dem Biotinmangelsignal. Obwohl bei den ELISA-Tests zur Bestimmung der internen freien Biotinkonzentration nicht zwischen Biotin und Biotinyl-AMP unterschieden werden konnte (vgl. Kapitel 2.2.4.4), ist die Spekulation, dass Biotinyl-AMP ähnlich wie in Säugern das vorrangige Biotinsignal in *S. cerevisiae*-Zellen darstellen könnte [Pirner und Stolz, 2006], durch das nach den neuen Ergebnissen nötige Einbinden der Pyc-Proteine in der Biotinsignalkette nicht mehr wahrscheinlich. Wie auch in der Publikation von Pirner und Stolz [2006] schon erwähnt, fehlen in Hefe zudem Homologe der Guanylatzyklase und der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.

4.4 Die Pyruvatcarboxylasen spielen eine direkte Rolle bei der Biotinwahrnehmung

Die Untersuchungen in Kapitel 4.3 belegen, dass die Pyruvatcarboxylasen eine direkte Aufgabe bei der Wahrnehmung von Biotin haben. Nach der Deletion beider Pyc-Gene ist in *S. cerevisiae* eine Biotinmangelantwort selbst bei starkem intrazellulären Biotinmangel nicht möglich (vgl. Abb. 3-26). Bei den β -Galaktosidasetests zeigte sich, dass wohl hauptsächlich Pyc2p Einfluss auf die Biotinmangelantwort besitzt. Bei *pyc1*-Mutanten ist die Biotinmangelantwort trotz Reduktion der Reportergenexpression sogar leicht erhöht (vgl. Abb. 3-24 und 3-29; Tab. 3-3, Seite 78). Eine Ausnahme bildet hierbei nur der Aufnahmetest mit radioaktiv markiertem Biotin (vgl. Tab. 3-2, Seite 77), bei dem im Falle von *pyc1* die Biotinmangelantwort auch deutlich reduziert war. Dieser Effekt trat aber nur bei der Untersuchung von W303-1A basierten Stämmen auf und ist bei BY4741 basierten Stämmen nicht nachweisbar.

Die Pyruvatcarboxylasegene *PYC1* und *PYC2* sind eine Konsequenz der Genomduplikation („whole-genome duplication“), die in der Evolution von *S. cerevisiae* stattgefunden hat [Wolfe und Shields, 1997; Langkjaer *et al.*, 2003] und zeigen mit einer Homologie von 92 % [Stucka *et al.*, 1991] bzw. 93 % [Val *et al.*, 1995] auf Aminosäureebene einen hohen Grad an Konservierung. Größere Unterschiede sind jedoch vor allem in den C-terminalen Biotinbindedomänen mit einer Homologie von nur 62 % und besonders auch am C-Terminus zu finden [Stucka *et al.*, 1991; Val *et al.*, 1995].

Stucka *et al.* [1991] gibt mehrere Gründe an, warum Organismen duplizierte Gene bewahren. So gibt es Isoenzyme mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation [Kim K. S. *et al.*, 1986; Rickey und Lewin, 1986], Isoenzyme, die sich in der Regulation der Expression unterscheiden [McAlister und Holland, 1982, 1985] und solche, bei denen eins der Enzyme neben der katalytischen auch eine regulatorische Rolle besitzt [Entian und Frohlich, 1984]. Zu den Eigenschaften von *PYC1* und *PYC2* findet man in der Literatur recht unterschiedliche Angaben. Nach Stucka *et al.* [1991], Menendez und Gancedo [1998] und Blazquez *et al.* [1995] können z.B. beide Gene das Wachstum in Glukose erhalten, während nach Brewster *et al.* [1994] *pyc1*-Mutanten den Zusatz von L-Aspartat für ein normales Wachstum in Minimalmedium brauchen. Auch finden die einen kaum einen Unterschied [Stucka *et al.*, 1991], die anderen dagegen signifikante Unterschiede [Walker M. E. *et al.*, 1991; Brewster *et al.*, 1994] in den Aktivitäten der beiden Isoenzyme. Schließlich gibt es auch widersprüchliche Angaben, inwieweit die Expression der Pyc-Gene durch die Wachstumsphase oder die Kohlenstoffquelle beeinflusst wird [Brewster *et al.*, 1994; Menendez und Gancedo, 1998]. Eine mögliche Ursache für die genannten Differenzen könnten der unterschiedliche genetische Hintergrund (W303-1A [Stucka *et al.*, 1991; Blazquez *et al.*, 1995;

Menendez und Gancedo, 1998] bzw. S288C und DBY746 [Brewster *et al.*, 1994]) sowie die damit verbundenen polymorphen Formen von Pyc2p [Stucka *et al.*, 1991; Val *et al.*, 1995] sein. Es ist jedoch sicher, dass beide Pyc-Gene unterschiedlich und unabhängig reguliert werden und sie jeweils andere Promotorelemente aufweisen [Stucka *et al.*, 1991; Brewster *et al.*, 1994; Menendez und Gancedo, 1998]. Die Expression ist aber bei beiden Proteinen unabhängig von der Biotinkonzentration im Medium (vgl. Kapitel 3.1.2.1 und Abb. 3-27). Außerdem zeigen die Pyc-Proteine in den Western Blot-Analysen nach Anzucht in Niedrig-Biotinmedium scheinbar den geringsten Verlust an biotintragendem Enzym im Vergleich zu den anderen Biotinproteinen (vgl. Abb. 3-11). Die Trennung von C-terminal markierten Pyc-Varianten im SDS-Gel machte aber deutlich, dass die Biotinbande von Pyc2p schwächer ist als die von Pyc1p und bei Biotinmangel nahezu ganz verschwindet (vgl. Abb. 3-27). Eine Veränderung der Effizienz der Biotinylierung durch die Markierung ist unwahrscheinlich, da der markierte C-Terminus zusammen mit dem N-terminalen Ende der biotintragenden Domäne in einem β -Faltblatt weit entfernt von dem Biotinyl-Lysinrest im exponierten β -Turn eines anderen Faltblattes liegt (vgl. 1.2.3.3 und [Polyak *et al.*, 2001]).

Die Hypothese, dass Biotinmangel über eine Unterbiotinylierung von Pyc2p wahrgenommen wird, konnte im Laufe der Arbeit trotzdem nicht endgültig geklärt werden. Erstens kann man über den Biotinylierungsgrad (das Verhältnis von Apoprotein zu Holoprotein) anhand der Western Blots keine Aussage machen, da nur relative Expressionslevel zweier verschiedener Anzuchtbedingungen verglichen wurden und keine absoluten Proteinmengen bestimmt werden konnten. Zweitens führte die Substitution des biotintragenden Lysins zwar wie erwartet zu einem Verlust der Biotinylierbarkeit und der Aktivität von Pyc2p (vgl. Abb. 3-28), jedoch auch, genauso wie bei *pyc24*, zu einem kompletten Verlust der Biotinwahrnehmung im *pyc1*-Hintergrund (vgl. Abb. 3-29). Ein Anstieg der Reportergenexpression aufgrund des unbiotinylierten Apoproteins blieb aus. Es ist daher nicht eindeutig geklärt, ob die Unterbiotinylierung von Pyc2p doch kein Signal in der Biotinwahrnehmung darstellt, oder ob die Wechselwirkung von Pyc2p mit einem weiteren Protein durch die Mutation gestört ist. Eventuell ist in der Mutante die Struktur der Biotinylierungsdomäne verändert, obwohl der biotintragende Lysinrest an der Spitze eines β -Turns exponiert vorliegt und deswegen eine Mutation die Struktur des β -Barrels kaum stören sollte (vgl. Kapitel 1.2.3.3).

Obwohl der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p bislang eine indirekte Rolle bei der Biotinwahrnehmung zugesprochen wurde, könnte trotzdem auch eine fehlende Wechselwirkung der Pyc2p-Mutante mit Bpl1p zu dem Ausbleiben der Biotinmangelantwort führen. Nach Polyak *et al.* [2001] ist es möglich, dass die Anwesenheit eines korrekt positionierten Ziel-Lysinrestes, eingebettet in eine

strukturierte Biotinylierungsdomäne, für die Erkennung durch die Bpl1p erforderlich ist. Versuche mit *E. coli* BCCP-Mutanten, bei denen der biotintragende Lysinrest durch Leucin ausgetauscht wurde, zeigten schon, dass diese Mutanten die Biotinylierung der nativen Biotindomäne durch BirA nur schwach inhibierten und damit offensichtlich kaum mit BirA wechselwirken konnten [Chapman-Smith *et al.*, 1999; Polyak *et al.*, 2001]. Genauso wäre es im Falle von Pyc2p auch möglich, dass aufgrund des Lys/Arg-Austausches die Erkennung der unbiotinylierten Biotindomäne durch ein anderes Sensorprotein unterbunden wird. Schließlich könnte auch eine von der Biotinylierungsstelle unabhängige Region, welche jedoch für die Biotinmangelantwort wichtig ist, durch den Aminosäureaustausch beeinflusst sein und ihre Funktionalität verloren haben.

Um den Einfluss einer deutlich erhöhten Konzentration einer Biotindomäne auf die Biotinwahrnehmung in *S. cerevisiae* zu untersuchen, wurde die biotintragende Domäne von Pyc1p in den Zellen überexprimiert (Daten nicht gezeigt). Letztlich konnte hier aber nicht differenziert werden, ob die im β -Galaktosidasetest gemessenen erhöhten Reportergenaktivitäten primär aufgrund des vermehrten Auftretens von unbiotinylierter Pyc1p-Biotindomäne erzeugt wurden (der Biotinylierungsgrad von Pyc-Biotindomänen ist in einem gewissen Rahmen unabhängig vom Expressionslevel [Val *et al.*, 1995]; bei verstärkter Expression steigt damit die Menge an biotinfreiem Protein) oder eher indirekt durch die allgemeine Erhöhung des Biotinbedarfs. Diesbezüglich würde jedoch auch die Expression einer Pyc2p-Biotindomäne keinen Aufschluss bringen.

Bei den Untersuchungen zur Biotinylierung der Pyc-Proteine wurden genomisch markierte Versionen der Enzyme eingesetzt. Die C-terminale Markierung mit 3HA bzw. 9Myc scheint dabei weder die Biotinylierbarkeit noch die Funktionalität der Pyruvatcarboxylasen zu beeinträchtigen (vgl. Abb. 3-27 und 3-29). Auffällig ist jedoch, dass die Markierung der Proteine (wiederum hauptsächlich die von Pyc2p) die Biotinmangelantwort stört. So war in dem *pyc1* *PYC2*-9Myc-Stamm die Reaktion der Zellen auf Biotinmangel gegenüber dem WT-Stamm und vor allem auch gegenüber dem *pyc1*-Stamm gehemmt (vgl. Abb. 3-29). Dasselbe galt auch für den *PYC2*-9Myc-Stamm und in geringem Maße für *PYC1*-3HA (Daten nicht gezeigt). Ein Test mit markiertem Pyc1p im *pyc2*-Hintergrund wäre nicht weiter aufschlussreich, da schon in *pyc2*-Mutanten die Biotinwahrnehmung fast nicht mehr möglich ist. Dies ist ein Hinweis, dass zumindest der C-terminale Bereich von Pyc2p eine wichtige Rolle in der Biotinmangelantwort spielt.

Bei Pyruvatcarboxylasen folgt nach der N-terminalen ATP-Binde- bzw. Biotincarboxylierungsdomäne die Pyruvatbinde- bzw. Carboxyltransferasedomäne und schließlich

C-terminal die Biotinbindedomäne (vgl. die in Abb. 4-1 angegebenen Swiss-Prot-Einträge und [Lim *et al.*, 1988]).

Interessanterweise besitzen die Pyruvatcarboxylasen aus Bäckerhefe nach der Biotinylierungsdomäne einen um meist 9 (Pyc1p) bzw. 10 Aminosäuren (Pyc2p) verlängerten C-Terminus gegenüber ihren homologen Proteinen und den meisten anderen Biotinproteinen aus verschiedenen Organismen. Der biotintragende Lysinrest ist damit statt der sonst üblichen 35 Aminosäuren 44 bzw. 45 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt (vgl. Abb. 4-1; Kapitel 1.2.3.3; Einträge bei Swiss-Prot bzw. SGD und [Morris *et al.*, 1987; Val *et al.*, 1995]). Eine Ausnahme bilden hierbei nur die Acetyl-CoA-Carboxylasen, bei denen die biotintragende Domäne zwischen der Biotincarboxylierungsdomäne und der Carboxyltransferasedomäne in der Polypeptidkette angeordnet ist (vgl. Abb. 4-1). Außerdem befindet sich bei Pyc2p in diesem C-terminalen Abschnitt ein Serinrest, welcher eventuell eine Phosphorylierungs- und damit auch eine Regulationsstelle darstellen könnte. Zusätzlich ist zu beachten, dass im Stammhintergrund von W303-1A, zu dem die hier verwendeten Pyruvatcarboxylasemutanten gehören, das Pyc2p-Protein sogar um zusätzliche 5 Aminosäuren verlängert ist [Stucka *et al.*, 1991; Val *et al.*, 1995].

Eine ähnliche Ausnahme bildet auch die Pyruvatcarboxylase aus *Pichia pastoris* mit einem 15 Aminosäuren langen Serin-enthaltenden C-terminalen Anhang [Menendez *et al.*, 1998]. Es wäre somit aufschlussreich zu überprüfen, ob hier die Pyruvatcarboxylase ebenfalls eine essentielle Rolle in der Biotinwahrnehmung spielt und wie die Situation in *S. pombe* ist, deren Pyc-Protein nur eine Verlängerung um 2 Aminosäuren aufweist (Abb. 4-1).

Die Pyruvatcarboxylasen aller drei Stämme sind im Cytosol lokalisiert [Rohde *et al.*, 1991; Walker M. E. *et al.*, 1991], was einen weiteren Unterschied zu den mitochondriellen Pyruvatcarboxylasen aus Vertebraten darstellt.

		10	20	30	40	50	60
Sc_PYC1	1101	-----L	HIGAPMAGVI	V-----EV	KVHKGS LIKK	GQPVAVLSAM	KMEMIISSPS
Sc_PYC2	1102	-----H	QIGAPMAGVI	I-----EV	KVHKGS LVKK	GESIAVLSAM	KMEMVVSSPA
Pp_PYC	1106	-----N	EIGAPMAGVV	V-----EV	RVHENG EVKK	GDPIAVLSAM	KMEMVISSPV
Sp_PYC	1115	-----G	HVAAPMSGTI	V-----EI	RVKEGAKVKK	GDIIAVLSAM	KMEIVISAPH
Mm_PYC	1110	-----G	QIGAPMPGKV	I-----DI	KVAAGDKVAK	GQPLCVLSAM	KMETVVTSPM
Rn_PYC	1110	-----G	QIGAPMPGKV	I-----DV	KVAAGAKVVK	GQPLCVLSAM	KMETVVTSPM
Hs_PYC	1110	-----G	QIGAPMPGKV	I-----DI	KVVAGAKVAK	GQPLCVLSAM	KMETVVTSPM
Bs_PYC	1078	-----S	HIAASMPGTV	I-----KV	LAEAGTKVKN	GDHLMINEAM	KMETTVQAPF
Kp_OAD	528	-----T	PVTAPLAGTI	W-----KV	LASEGQTVAA	GEVLLILEAM	KMETEIRAAQ
Ps_TC	55	-----G	EIPAPLAGTV	S-----KI	LVKEGDTVKA	GQTVLVLEAM	KMETEINAPT
Sc_DUR1	1755	EEEDFPEGAE	IVYSEYSGRF	W-----KS	IASVGDVIEA	GQGLLIIEAM	KAEMIISAPK
Ec_BCCP	81	-----H	IVRSPMVGT	F YRTPSPDAKA	FIEVGQKVVN	GD TLCIVEAM	KMMNQIEADK
Hs_PCCA	635	-----S	VLRSPMPGVV	V-----AV	SVKPGDAVAE	GQEICVIEAM	KMQNSMTAGK
Sc_ACC1	701	-----T	QLRTPSPGKL	V-----KF	LVENGHEHIK	GQPYAEIEVM	KMQMPLVSQE
Sc_HFA1	770	-----T	QVISPTPGKL	V-----KY	LVRSGDHVFA	GQQYAEIEIM	KMQMPLVAKS
			*		*	*	* **
		70	80	90	100		
Sc_PYC1		DGQVKEVFVS	DGENVDSSDL	LVLLEDQ-VP	VETKA*	1178	
Sc_PYC2		DGQVKDVFIK	DGESVDASDL	LVLLEETLP	PSQKK*	1180	
Pp_PYC		AGRIGQIAVK	ENDSVASDL	IPKSSRLSKL	LMFIILIIILY*	1189	
Sp_PYC		SGVLKSLAVV	QGDSVNGGDL	CAVLEHE*		1185	
Mm_PYC		EGTIRKVHVT	KDMTLEGDDL	ILEIE*		1178	
Rn_PYC		EGTIRKVHVT	KDMTLEGDDL	ILEIE*		1178	
Hs_PYC		EGTVRKVHVT	KDMTLEGDDL	ILEIE*		1178	
Bs_PYC		SGTIKQVHVK	NGEPIQTGDL	LLEIEKA*		1148	
Kp_OAD		AGTVRGIQVAVK	AGDAVAVGDT	LMTLA*		596	
Ps_TC		DGKVEKVLVK	ERDAVQGGQG	LIKIG*		122	
Sc_DUR1		SGKIIKICHG	NGDMVDSGDI	VAVIETLA*		1835	
Ec_BCCP		SGTVKAILVE	SGQPVEFDEP	LVVIE*		156	
Hs_PCCA		TGTVKSVHCQ	AGDTVGEGLD	LVELE*		703	
Sc_ACC1		NG-IVQLLKQ	PGSTIVAGDI	MAIMTLDDPS	KVKHALPFEG	783	
Sc_HFA1		DG-VIELLRQ	PGSIIEAGDV	IAKLTLDSPS	KANESSLYRG	852	
		*					

Abb. 4-1: Sequenzvergleich von Biotindomänen verschiedener Proteine. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von CLUSTALW von PBIL durchgeführt (über ExpASY-Sequence alignment-PBIL: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) und ist analog dem Sequenzvergleich von Stolz *et al.* [1998]. Die Proteinsequenzen und die Ausdehnung der biotintragenden Domänen (Beginn der gezeigten Sequenz bis Begrenzungsstrich) wurden der Swiss-Prot-Datenbank entnommen. Der biotintragende Lysinrest wird durch ein schwarzes Dreieck angezeigt und die hoch konservierten Glycin- bzw. Methioninreste werden durch Sternchen markiert. Im Folgenden werden die Abkürzungen und die jeweilige Swiss-Prot-Nummer aufgeführt. Sc_PYC1: [P11154], Pyruvatcarboxylase 1 aus *S. cerevisiae*; Sc_PYC2: [P32327], Pyruvatcarboxylase 2 aus *S. cerevisiae*; Pp_PYC: [P78992], Pyruvatcarboxylase aus *P. pastoris*; Sp_PYC: [Q9UUE1], Pyruvatcarboxylase aus *S. pombe*; Mm_PYC: [Q05920], Pyruvatcarboxylase aus Maus (*M. musculus*); Rn_PYC: [P52873], Pyruvatcarboxylase aus Ratte (*R. norvegicus*); Hs_PYC: [P11498], menschliche Pyruvatcarboxylase (*H. sapiens*); Bs_PYC: [Q9KWU4], Pyruvatcarboxylase aus *B. subtilis*; Kp_OAD: [P13187], α -Untereinheit der Oxalacetatdecarboxylase aus *K. pneumoniae*; Ps_TC: [P02904], 1.3S Untereinheit der Transcarboxylase aus *P. shermanii*; Sc_DUR1: [P32528], Harnstoffamidolyase aus *S. cerevisiae*; Ec_BCCP: [P0ABD8], Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein der Acetyl-CoA-Carboxylase aus *E. coli*; Hs_PCCA: [P05165], α -Kette der menschlichen Propionyl-CoA-Carboxylase (*H. sapiens*); Sc_ACC1: [Q00955], Acetyl-CoA-Carboxylase aus *S. cerevisiae*; Sc_HFA1: [P32874], mitochondrielle Form der Acetyl-CoA-Carboxylase aus *S. cerevisiae*.

Es ist allerdings nicht ganz auszuschließen, dass die beobachteten Effekte in der Biotinwahrnehmung durch die Markierung des Pyc2p-C-Terminus letztlich doch auf eine verringerte Biotinylierungseffizienz zurückgehen. Bei der Markierung von Pyc2p mit dem 9Myc-Epitop wurde nämlich für das Design der Primer die in SGD veröffentlichte Sequenz von *PYC2*

herangezogen (vgl. Kapitel 2.2.2.14), welche von der Sequenz im W303-1A-Stamm abweicht [Stucka *et al.*, 1991]. Deshalb fehlen Pyc2p-9Myc die fünf letzten Aminosäuren des WT-Proteins. Nach Val *et al.* [1995] weisen Peptide aus den kürzeren Biotindomänen von Pyc2p einen geringeren Biotinylierungsgrad durch die BPL aus *E. coli* auf. Andererseits führt die Markierung wieder zu einer künstlichen Verlängerung der Biotindomäne und es ist zudem nicht gewiss, ob sich die von den Autoren beobachteten Phänomene auf Vollängenproteine und die BPL aus *S. cerevisiae* übertragen lassen.

Um die Rolle des C-Terminus weiter zu analysieren, könnte man Verkürzungsprodukte der Pyruvatcarboxylasen bzw. auch nur die entsprechenden Biotindomänen [Val *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 2001] in Pyc-Doppeldeletionsmutanten exprimieren und die Biotinwahrnehmung prüfen.

Neben der enzymatischen Aktivität in der Synthese von Oxalacetat scheint eine Rolle in der Biotinmangelantwort allerdings nicht die einzige weitere Funktion der Pyruvatcarboxylasen zu sein. So deuten Ergebnisse von Brewster *et al.* [1994] darauf hin, dass der Glyoxylatzuklus ohne ausreichende Pyc-Aktivität durch eine C2-Kohlenstoffquelle nicht stimuliert wird.

In methylotrophen Hefen wie *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris* ist die cytosolische Pyruvatcarboxylase außerdem an der Aktivierung der Alkoholoxidase (AO), einem Schlüsselenzym des Methanolmetabolismus, beteiligt [Ozimek P. *et al.*, 2003]. Hierbei spielt sie vermutlich eine Rolle bei der FAD-Bindung an AO-Monomere, was wiederum eine Voraussetzung für den Import der AO-Monomere in die Peroxisomen und die anschließende Oligomerisierung zu einer aktiven AO ist. Diese Aufgabe kann aber auch eine enzymatisch inaktive Pyruvatcarboxylase erfüllen [Ozimek P. *et al.*, 2003]. In *H. polymorpha* wurde gezeigt, dass die Transcarboxylasedomäne von Pyc1p (dem einzigen Pyc-Protein in *H. polymorpha*) zusammen mit einer Region zwischen der Transcarboxylasedomäne und der Biotincarboxylasedomäne für die Funktion bei der AO-Oligomerisierung essentiell ist [Ozimek P. Z. *et al.*, 2007]. Obwohl die Pyruvatcarboxylasen aus *S. cerevisiae* eine Homologie von etwa 75 % zu Pyc1p aus *H. polymorpha* aufweisen, können sie diese jedoch bei der Aktivierung der AO nicht ersetzen [Ozimek P. *et al.*, 2006].

4.5 Vhr1p ist ein essentielles Protein in der Biotinwahrnehmung

Zeitgleich mit der Publikation [Pirner und Stolz, 2006], die aus den Daten dieser Arbeit hervorging, wurden auch die Ergebnisse über die Wahrnehmung von Biotin in Hefe von Weider *et al.* [2006] veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde durch die Komplementation eines EMS-mutagenisierten Reporterstamms, welchem es nicht mehr möglich war GFP unter der Kontrolle

des *VHT1*-Promotors bei Niedrig-Biotinbedingungen zu exprimieren, das Gen *VHR1* („*VHT1* regulator 1“) identifiziert und charakterisiert. Vhr1p ist ein essentielles Protein in der biotinabhängigen Regulation von *VHT1* und *BIO5* und besitzt wahrscheinlich die Funktion eines Transkriptionsfaktors in der Biotinmangelantwort. Die Expression von *VHR1* erfolgt vermutlich biotinunabhängig [Weider, 2006] und das Protein wurde sowohl bei induzierenden als auch nicht-induzierenden Bedingungen (zumindest vorwiegend) im Kern lokalisiert. Allerdings ist die Lokalisation von GFP-Vhr1p im Zellkern aufgrund der gezeigten Fluoreszenzbilder bei Weider *et al.* [2006] nicht eindeutig nachzuvollziehen und auch bei Huh *et al.* [2003], deren Ergebnisse mit Vhr1p-GFP von den Autoren zitiert wurden, wurde die Lage nicht eindeutig auf Cytoplasma oder Zellkern festgelegt. Außerdem haben Weider *et al.* [2006] nicht die Funktionalität der GFP-Vhr1p- bzw. Vhr1p-GFP-Fusionsproteine geprüft. Untersuchungen von Weider [2006] mit Vhr1p-myc belegen jedoch, dass C-terminale Markierungen den proteolytischen Abbau von Vhr1p fördern und die Funktion des Proteins behindern. Zudem sind N-terminal 3HA-markiertes Vhr1p und die mit GFP, HA oder ZZ markierten C-terminalen Versionen von Vhr1p nicht funktionell (unveröffentlichte Daten von Stefan Ringlstetter, TU München). Andererseits haben Vhr1p und sein homologes Protein YER064cp (welches jedoch keinen Einfluß auf die Expression von *VHT1* besitzt) putative Kernlokalisationssignale, die mit den putativen Helix-Turn-Helix-Motiven im N-terminalen Bereich überlappen [Weider, 2006], und YER064cp wird von Huh *et al.* [2003] im Kern lokalisiert.

Vhr1p besitzt zwei funktionell voneinander unabhängige konservierte Bereiche: eine N-terminale DNA-Bindedomäne, welche zumindest zum Teil auch bei Normal-Biotinbedingungen an die UAS_{BIO} bindet (3x Steigerung der Bindeaktivität bei Biotinmangel), und eine C-terminale Aktivierungsdomäne, die bei Biotinmangel die Aktivierung der Transkription induziert (10x Steigerung der Aktivierung gegenüber Normalbedingungen) [Weider *et al.*, 2006]. Interessant ist, dass Vhr1p von Weider *et al.* [2006] keiner bekannten Klasse von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. Zinkfingerproteine) zugeordnet werden konnte und homologe Proteine nur in nah verwandten Hefen vorkommen, was nach Ansicht der Autoren ein Hinweis dafür sein könnte, dass die Biotinregulation in *S. cerevisiae* spezifisch für Hefen der Ordnung *Saccharomycetales* ist.

Dass keines der Pyc-Gene bei dem EMS-Screening von Weider *et al.* [2006] gefunden wurde ist gut erklärbar, denn für einen kompletten Verlust der *VHT1*-Promotor-Induktion müssten erstens die Funktionen beider Pyc-Gene bei der Mutagenese zerstört werden und zweitens könnten die entsprechenden Klone dann nur bei Zusatz von L-Aspartat wachsen.

Weider *et al.* [2006] favorisieren ein einfaches Regulationsmodell, in dem Vhr1p, ähnlich wie die Bpl1p bei *E. coli* (vgl. Kapitel 1.2.7), einen löslichen oder, wie z.B. bei der Prolinwahrnehmung in

S. cerevisiae durch Put3p (zusammenfassende Darstellung in [Sellick und Reece, 2005]), einen an die Ziel-DNA gebundenen Biotinsensor darstellt und so ohne weitere Proteininteraktionen die Regulation der Biotingene steuert. Dieses Modell kann nicht mit der in dieser Arbeit gezeigten essentiellen Funktion der Pyruvatcarboxylasen bei der Biotinwahrnehmung in Einklang gebracht werden. Außerdem scheint weder freies Biotin noch Biotinyl-5'-AMP der Signalgeber zu sein (vgl. Kapitel 4.3). Somit scheidet auch ein alternatives Modell mit einem mit Vhr1p interagierenden Protein als Sensor für Biotin-5'-AMP [Weider, 2006] aus.

Schließlich ist auch die Vorstellung eines direkt biotinylierten Vhr1p als Sensor [Weider, 2006] unwahrscheinlich. Vhr1p besitzt zwar (gemessen in Vollmedium) im Vergleich zu den meisten der biotintragenden Proteine in *S. cerevisiae* eine geringe Molekülzahl pro Zelle [Ghaemmaghami *et al.*, 2003], womit man die fehlende Biotinbande des 71 kDa großen Proteins im Western Blot rechtfertigen könnte. Außerdem ist, wie man am Beispiel des biotintragenden Proteins Arc1p sehen kann, eine klassische Biotindomäne für die Biotinylierung durch die Bpl1p nicht zwingend nötig. Andererseits kann auch mit diesem Modell die Rolle der Pyc-Proteine nicht erklärt werden (vgl. auch Kapitel 4.3).

Geht man davon aus, dass Vhr1p wirklich biotinunabhängig im Kern lokalisiert ist, muss man annehmen, dass mindestens ein weiteres Protein bei der Wahrnehmung von Biotinmangel in Hefe beteiligt ist, da Pyc1p und Pyc2p in *S. cerevisiae* cytoplasmatische Proteine sind.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit und der von Weider [2006] lassen sich wie folgt zusammenführen: (1) Die Biotinwahrnehmung in *S. cerevisiae* erfolgt intrazellulär und unabhängig vom Biotintransporter Vht1p. (2) Freies Biotin bzw. Biotinyl-AMP ist kein Signalgeber und die BPL spielt vermutlich eine indirekte, wenngleich wichtige Rolle. (3) Auch die Wahrnehmung von Biotinmangel durch fehlende Produkte aus den enzymatischen Reaktionen der biotintragenden Carboxylasen wird ausgeschlossen. (4) Die meisten Biotinproteine sind für eine Biotinmangelantwort nicht essentiell. (5) Fehlen beide Pyruvatcarboxylasen bzw. können diese durch eine Mutation des biotintragenden Lys-Restes nicht biotinyliert werden, erfolgt keine Induktion des Biotinsystems. Pyc2p scheint dabei die größere Rolle in der Biotinwahrnehmung zu spielen. (6) Vhr1p ist ein im Kern lokalisierter Transkriptionsfaktor, dessen Fähigkeit zur DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung jeweils durch Biotinmangel stimuliert wird.

In Abb. 4-2 sind mögliche Zusammenhänge bei der Biotinwahrnehmung graphisch dargestellt.

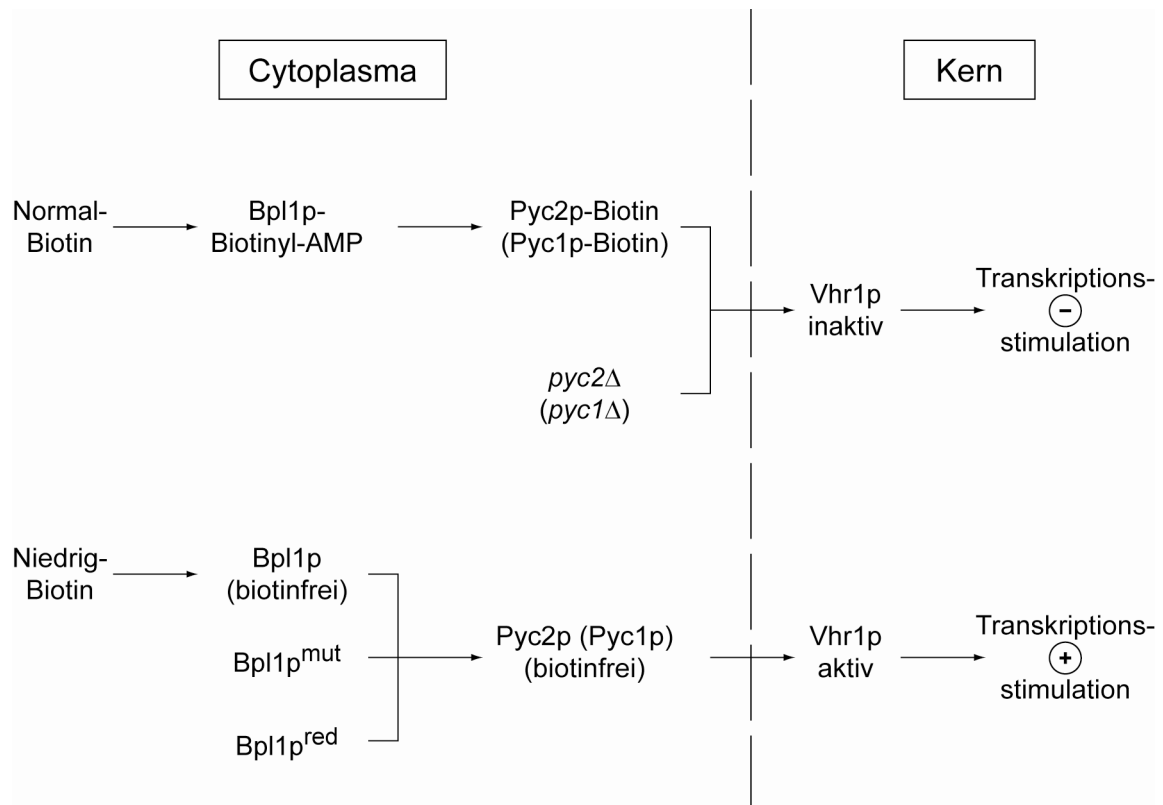


Abb. 4-2: Graphische Darstellung möglicher Zusammenhänge bei der Biotinwahrnehmung in *S. cerevisiae*. Steht der Bäckerhefe ausreichend Biotin zur Verfügung, so führt dies zur Bildung von Bp1p-gebundenen Biotinyl-AMP und biotinyltem Pyc2p in der Zelle. Unter dieser Voraussetzung ist der biotinabhängige Transkriptionsaktivator Vhr1p inaktiv. Zu dem gleichen Resultat führt eine Deletion des *PYC2*-Gens. Bei Biotinmangel, einem mutierten Bp1p-Enzym oder einer reduzierten Expression von Bp1p liegt ein hoher Anteil von Pyc2p in der Zelle biotinfrei vor. Vhr1p wird nicht länger inhibiert und die Transkription der biotinabhängig regulierten Gene stimuliert.

Es könnte also z.B. die biotinfreie Apoform der Pyruvatcarboxylasen (vor allem von Pyc2p) mit einem Protein wechselwirken, welches durch die Biotinylierung bzw. dem Fehlen der Pyc-Proteine frei wird, in den Kern diffundiert und die Funktion des Transkriptionsaktivators Vhr1p hemmt. Ein Wechsel von Transkriptionsfaktoren bzw. an der Regulation beteiligter Proteine zwischen Cytoplasma und Kern kennt man z.B. auch aus dem Galaktose-Regulationssystem (zusammenfassende Darstellung in [Sellick und Reece, 2005]) und beim eisenabhängigen Transkriptionsfaktor Aft1p [Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002]. Die Regulation der Gene des Galaktosemetabolismus erfolgt durch das Zusammenspiel des Transkriptionsaktivators Gal4p, des Transkriptionsrepressors Gal80p und des mutmaßlichen Galaktosesensors Gal3p. Bei Abwesenheit von Galaktose liegt Gal4p zwar gebunden an die Ziel-DNA vor, wird jedoch durch den Komplex mit Gal80p inhibiert. Wird Hefe in Galaktose als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen, interagiert Gal3p Galaktose- und ATP-abhängig mit Gal80p und die Gene des Galaktosemetabolismus werden induziert [Sellick und Reece, 2005]. Hierbei ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, ob Gal3p vom Cytoplasma in den Kern wandert und mit Gal4p und Gal80p einen ternären Komplex bildet [Platt und Reece, 1998] oder Gal80p von Gal4p

abdissoziiert und mit Gal3p im Cytoplasma wechselwirkt [Peng und Hopper, 2000]. Bei Aft1p wurde durch Yamaguchi-Iwai *et al* [2002] gezeigt, dass die Aktivierung der entsprechenden Gene bei Eisenmangel nicht durch eine Veränderung der Aft1p-Expression oder der DNA-Bindeaktivität erfolgt, sondern durch die Verlagerung von Aft1p vom Cytoplasma in den Kern.

Neben der Suche nach einem Bindeglied zwischen den Pyc-Proteinen und Vhr1p und der Funktion der Pyc-Proteine bei der Biotinwahrnehmung gibt es noch weitere interessante Fragen. Arc1p ist nach den hier vorliegenden Daten für die Reaktion der Zelle auf Biotinmangel nicht essentiell. Unklar ist noch, welche Funktion die Biotinylierung von Arc1p eigentlich hat. Das Protein mit einer nichtkanonischen Biotindomäne kann nur durch die Bpl1p aus *S. cerevisiae* biotinyliert werden und nicht, wie es bei den anderen Biotinproteinen aus Hefe möglich ist, über BirA aus *E. coli* [Kim H. S. *et al.*, 2004], obwohl BirA sogar Peptide mit einer untypischen Primärstruktur modifizieren kann [Schatz, 1993; Beckett *et al.*, 1999]. Außerdem führt Arc1p keine Carboxylierungsreaktion aus und seine Biotinylierung scheint keinen Einfluss auf seine physiologische Funktion zu haben [Kim H. S. *et al.*, 2004].

4.6 Ungerichtete Suche nach Mitgliedern der Biotinsignalkette und Verküpfungen zwischen Biotin- und Eisenmetabolismus

Ähnlich wie bei Weider [2006] wurde auch in dieser Arbeit eine EMS-Mutagenese mit einem Reporterstamm (hier ein Stamm, dessen *HIS3*-Gen und somit die Histidinsynthese biotinabhängig kontrolliert ist) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.1). Die Klone sollten später mit Hilfe von Komplementationstests zur Suche nach Gliedern der Biotinmangel-Signalkette eingesetzt werden. Hier wurde nach Mutanten gesucht, die eine konstitutiv erhöhte Expression der Biotingene zeigen. Da eine Mutation meist eher zum Defekt eines Gens führt als zu einer Aktivierung des entsprechenden Proteins, konnte man kaum erwarten, einen Transkriptionsaktivator wie Vhr1p zu finden. Spielt bei der Signalkette allerdings auch ein Repressorprotein eine Rolle, so würde ein Defekt in diesem Gen zu dem gesuchten BHB-Phänotyp führen. Um aus der recht großen Anzahl der erhaltenen Klone uninteressante Mutanten herauszufiltern wurden verschiedene Tests durchgeführt. Die meisten Klone mit besonders starken Phänotypen (bezüglich Stimulation der *BIO2*-Expression und Wachstum auf AT-Platten) scheinen Mutationen in den Genen *VHT1* bzw. *BPL1* zu tragen. Im Gegensatz zu diesen Klonen zeigten fast alle der verbleibenden 15 BHB-Mutanten eine normale Biotinylierung der biotintragenden Proteine und sind vielleicht gerade deswegen aussichtsreiche Kandidaten für einen Komplementationstest. Vor der Transformation

einer Genbank sollte allerdings noch sichergestellt werden, dass der Phänotyp der Klone rezessiv ist und damit komplementiert werden kann.

Mit dem Auftreten von *vht1*-Mutanten wurde zwar gerechnet, allerdings nicht mit einer so großen Häufigkeit, denn die Hefen sind aufgrund einer fehlenden *de novo*-Synthese auf die Aufnahme externen Biotins angewiesen. Noch erstaunlicher ist die hohe Anzahl der *bpl1*-Mutanten, da *BPL1* ein essentielles Gen ist und dem Minimalmedium keine Fettsäuren zugesetzt wurden. Eine Suppression des Phänotyps statt einer echten Komplementation der BHB-Mutation ist jedoch unwahrscheinlich, da für die Komplementationstests *CEN*-Plasmide eingesetzt wurden, die *VHT1* beziehungsweise *BPL1* unter der Kontrolle des eigenen Promotors trugen.

Wenn man davon ausgeht, dass Bpl1p in *S. cerevisiae* nur indirekt bei der Biotinwahrnehmung beteiligt ist, tragen *bpl1*-BHB-Mutanten, wie auch die *vht1*-Mutanten, nicht zur Aufklärung der Biotin-Signalkette bei.

Wenngleich der C-terminale Teil von Bpl1p wie auch der von anderen eukaryotischen Enzymen homolog zu BirA ist und das katalytische Zentrum mit ATP- und Biotinbindedomäne trägt [Chapman-Smith und Cronan, 1999a; Polyak *et al.*, 1999], so ist die genaue Rolle des N-terminalen Bereichs noch nicht klar, denn die eukaryotischen Bpl-Proteine enthalten im Gegensatz zu BirA keine bekannten DNA-Bindedomänen [Polyak *et al.*, 1999]. Die C- und N-terminalen Domänen scheinen aber miteinander zu interagieren, denn Polyak *et al.* [1999] konnte zeigen, dass beide für die Aktivität der Bpl1p nötig sind und der Aktivitätsverlust von verkürzten Bpl1-Enzymen nicht von erhöhten K_m -Werten stammt. Es gibt außerdem auch bei der menschlichen BPL Anzeichen für die funktionelle Bedeutung der N-terminalen Domäne. Verschiedene Punktmutationen in diesem Bereich führen zu der vererbaren metabolischen Krankheit MCD („multiple carboxylase deficiency“), bei der defekte BPL-Enzyme zu einem Aktivitätsverlust aller vier menschlichen biotinabhängigen Carboxylasen führen [Suzuki *et al.*, 1994; Dupuis *et al.*, 1996; Aoki *et al.*, 1997]. Da die N-terminalen BPL-Domänen aus Hefe und Mensch nur eine geringe Homologie aufweisen, kann man nur schwer analoge Reste identifizieren [Polyak *et al.*, 1999]. Daher könnten die im BHB-Screen identifizierten *bpl1*-Mutanten für die Identifizierung und Charakterisierung von Aminosäureresten und Enzymbereichen, die für die Funktion der Bpl1p wichtig sind, eingesetzt werden.

Der alternative Ansatz, EMS-Klone aufzuspüren, denen es nicht mehr möglich ist Biotinmangel wahrzunehmen bzw. das Signal weiterzuleiten (wie auch bei Weider *et al.* [2006]), wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Sandra Balser verfolgt. Hierbei wurden fünf interessante BLB-Klone („blind for low biotin“) gefunden, bei denen aber bislang eine Genbanktransformation (wurde nach dem Rückkreuzen der Stämme bei zwei Klonen durchgeführt) ohne Erfolg blieb. Eine

Möglichkeit für den BLB-Phänotyp der Klone wäre eine Mutation im *VHRI*-Gen, was durch Transformation eines *VHRI*-tragenden Plasmids und anschließende Kontrolle des Phänotyps überprüft werden sollte. Auch der Ausfall von *Pyc2p* würde die Hefen zu BLB-Mutanten machen. Allerdings gilt auch hier wieder, dass ein kompletter Verlust der Biotinwahrnehmung nur bei gleichzeitigem Ausfall beider *Pyc*-Gene auftritt und dies bei EMS-Mutagenese kaum zu erwarten ist.

Zur Suche nach Genen, welche bei Überexpression zu einer konstitutiven Biotinmangelantwort führen, wurde in dieser Arbeit eine Genbanktransformation in den Reporterstamm, der auch bei der EMS-Mutagenese verwendet wurde, durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.2). Entsprechende Klone sollten sich demnach im Gegensatz zum Ausgangsstamm auch bei Normal-Biotinbedingungen histidinprototroph verhalten. Bei der Sequenzierung von 19 ausgewählten Genbankplasmiden aus den ursprünglich erhaltenen 33 Klonen wurde zweimal das Gen *ATRI* gefunden. Dies war zu erwarten, denn *Atr1p*, eine „multidrug efflux“-Pumpe der „major facilitator superfamily“, vermittelt eine Resistenz gegen 3-Aminotriazol [Kanazawa *et al.*, 1988; Goffeau *et al.*, 1997]. 3-Aminotriazol hemmt das Genprodukt von *HIS3* [Klopotoski und Wiater, 1965] und wurde zur Erhöhung des Selektionsdrucks den histidinfreien Transformationsplatten zugesetzt.

Aufgefallen ist aber auch ein anderes Gen, *TIS11*, welches neben zwei unvollständigen Genstücken auf einem Genbankplasmid identifiziert wurde. *Tis11p* gehört zu den Zinkfinger-mRNA-Bindeproteinen, welche in Pilzen, Pflanzen und Tieren vertreten sind [Vergara und Thiele, 2008]. Unter normalen Wachstumsbedingungen sind die mRNA von *TIS11*, deren Expression durch Glukose reprimiert wird, und das dazugehörige Protein kaum nachzuweisen, und eine Deletion führt zu keinem erkennbaren Phänotyp [Ma und Herschman, 1995; Thompson *et al.*, 1996; Puig *et al.*, 2005]. Als Mitglied des Eisenregulons wird *Tis11p* bei Eisenmangel jedoch über die eisenabhängigen Transkriptionsfaktoren *Aft1p/Aft2p* stark induziert [Rutherford *et al.*, 2003; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004] und führt in einem posttranskriptionellen Prozess zum Abbau verschiedener mRNAs, die z.B. entbehrbare Fe-abhängige Proteine codieren. Dazu bindet *Tis11p* an AU-reiche RNA-Konsensussequenzen (AREs) im 3'-UTR-Bereich der Ziel-mRNAs [Puig *et al.*, 2005; Vergara und Thiele, 2008].

Obwohl *TIS11* auch in einem DNA-Array-Experiment (vgl. Kapitel 3.1.2.1) bei Niedrig-Biotinbedingungen gegenüber Normal-Biotinbedingungen leicht induziert war (1,9x), konnte in dieser Arbeit dem Gen weder eine direkte noch eine indirekte Rolle in der Biotinwahrnehmung zugewiesen werden. Weder Deletion noch Überexpression von *TIS11* zeigten im Vergleich zu WT-Zellen signifikante Unterschiede in der Biotinwahrnehmung. Hier muss man allerdings beachten, dass Wachstumstests äußerst sensitiv sind und eine Überexpression von *TIS11* weder durch Northern Blot- noch Western Blot-Analysen bestätigt wurde. Das Gen liegt zwar auf 2μ-

Plasmiden vor, die Expression könnte aber über seinen eigenen Promotor bzw. über die ARE-Sequenz im eigenen 3'-UTR-Bereich, eventuell mittels dem zu Tis11p homologen Protein Cth1p, kontrolliert sein [Thompson *et al.*, 1996; Ciais *et al.*, 2008]. Außerdem führt Tis11p zum Abbau einiger mRNAs, was vielleicht in zu großem Maße letal für die Zelle ist. Interessant ist, dass die Autoren Ciais *et al.* [2008], die den ARE-abhängigen Abbau von *TIS11* mRNA untersuchten (*TIS11* wird auch *CTH2* genannt), auch Schwierigkeiten hatten, reproduzierbare signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Trotzdem kann vermutet werden, dass mit Tis11p eine weitere Verknüpfung zwischen dem mehrfach ineinander verwobenen Biotin- und Eisenmetabolismen in Hefe bestehen könnte. Eine direkte Verbindung besteht z.B. durch die Biotinsynthase Bio2p, die ein 2Fe/2S- und ein 4Fe/4S-Cluster besitzt [Berkovitch *et al.*, 2004; Mühlenhoff *et al.*, 2007]. Die Expression von *BIO2* ist bei Eisenmangel oder gestörter Fe/S-Cluster-Synthese herabgesetzt [Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005; Mühlenhoff *et al.*, 2007]. Aber nicht nur die Transkription von *BIO2* wird eisenabhängig kontrolliert, sondern auch die Expressionsniveaus von *BIO3* und *BIO4* sind bei Eisenmangel reduziert [Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005] und *BIO5* und *VHT1* werden Aft1p-abhängig induziert [Rutherford *et al.*, 2003; Belli *et al.*, 2004; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004]. Western Blot-Ergebnisse zeigten allerdings, dass die Biotinylierung der biotintragenden Proteine bei veränderten Eisenkonzentrationen stabil bleibt (vgl. Abb. 3-43D).

Außerdem sind AREs, die mögliche Bindestellen für Tis11p darstellen, in den 3'-UTR-Bereichen von *BIO2*, *BIO3* und *BIO5* zu finden. Es konnte aber im Western Blot gezeigt werden, dass zumindest die Expression von *BIO2* nicht von Tis11p beeinflusst wird (vgl. Abb. 3-41). Des Weiteren ist die UAS_{BIO} für eine Fe-abhängige Regulation nicht nötig (vgl. Abb. 3-42). Erstaunlicherweise ist die Aft1p-Bindestelle im *VHT1*-Promotor dazu auch nicht zwingend erforderlich, da ein Reportergen unter der Kontrolle eines *VHT1*-Promotors mit mutierter Aft1-Bindestelle bei Eisenmangel noch signifikant induziert wurde (vgl. 3-42).

Interessant ist auch, dass bei hohen Eisenkonzentrationen eine biotinabhängige Regulation eines UAS_{BIO}-enthaltenden *VHT1*-Promotorstücks stattfand (vgl. Abb. 3-43B), diese aber unter Eisenmangelbedingungen vollständig ausblieb. Auch die Bio2p-Expression konnte bei Eisenmangel nicht durch Biotinmangel gesteigert werden (vgl. Abb. 3-43C). Die Verbindungen zwischen Eisen- und Biotinstoffwechsel in *S. cerevisiae* sind also sehr komplex und sollten weiter charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, es kann von fast allen *S. cerevisiae*-Stämmen nicht *de novo* synthetisiert werden und dient als prosthetische Gruppe bei Carboxylierungsreaktionen. Es war bekannt, dass die Bäckerhefe bei einem Mangel an Biotin mit einer Expressionssteigerung des Biotintransportergens *VHT1* reagiert [Stolz *et al.*, 1999]. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnte in dieser Arbeit in den Promotoren der meisten Gene aus dem Biotinmetabolismus ein konserviertes palindromisches DNA-Element identifiziert werden. Dieses ist als UAS_{BIO} notwendig und hinreichend für eine biotinabhängige Regulation. Western Blot- und Reporteranalysen, untermauert durch Daten aus Microarray- und Northern Blot-Experimenten, zeigten außerdem, dass neben *VHT1* auch die anderen Gene des Biotinmetabolismus bei Biotinmangel aktiviert werden.

Der Plasmamembrantransporter Vht1p ist nicht an der Wahrnehmung von Biotin beteiligt. Deletionsmutanten wiesen zwar eine Aktivierung der biotinregulierten Gene auf, dieser Effekt war aber nach der Gabe von Biotinvorstufen, die unabhängig von Vht1p aufgenommen und intrazellulär in Biotin umgewandelt werden, nicht länger zu beobachten. Dabei wurde auch die Wahrnehmung extrazellulären Biotins ausgeschlossen. Im Gegensatz zur Situation beim Ausfall anderer biotintragender Proteine wurde ein Biotin mangelsignal bei einer Deletion beider Pyruvatcarboxylasen, Pyc1p und Pyc2p, komplett verhindert. Somit sind die Pyruvatcarboxylasen essentiell für die Wahrnehmung von Biotin. Der genaue Funktionsmechanismus konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Aufgrund dieses Resultats wurde aber neben Vht1p auch der Biotin-Protein-Ligase Bpl1p, einem essentiellen Enzym, welches Biotin auf die Zielproteine überträgt, nur eine indirekte Rolle in der Biotinwahrnehmung zugeschrieben. Wie bei *vht1Δ*-Mutanten zeigten *bpl1*-Mutanten ebenfalls eine deutliche Expressionssteigerung der Biotingene, besaßen aber im Gegensatz zu *vht1Δ*-Mutanten normale Konzentrationen an freiem intrazellulären Biotin. Dieses ist deshalb für die Wahrnehmung von Biotinmangel nicht relevant.

Um unbekannte Glieder der Biotinsignalkette zu finden, wurde zum einen ein Reporterstamm mit EMS mutagenisiert und zum anderen mit einer multi-copy Genbank transformiert. Es konnten jeweils Klone mit einem konstitutiven Biotin mangelsignal (BHB, „blind for high biotin“) isoliert werden. Nach verschiedenen Tests zur Charakterisierung der Mutanten stehen 15 EMS-Klone für nachfolgende Komplementationstests zur Verfügung. Im anderen Ansatz konnte für keines der sequenzierten Genbankplasmide eine Beteiligung in der Biotinsignalkette nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz zeigt die hier erfolgte Identifizierung von *TIS11*, dem Gen eines eisenabhängigen Regulatorproteins, eine weitere interessante Verbindung von Biotin- und Eisenmetabolismus auf.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Hamid AM, Cronan JE.** 2007. In vivo resolution of conflicting in vitro results: synthesis of biotin from dethiobiotin does not require pyridoxal phosphate. *Chem Biol* **14**:1215-1220.
- Ackerman SH, Martin J, Tzagoloff A.** 1992. Characterization of ATP11 and detection of the encoded protein in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **267**:7386-7394.
- Alban C.** 2000. Is plant biotin holocarboxylase synthetase a bifunctional enzyme? *C R Acad Sci III* **323**:681-688.
- Alban C, Job D, Douce R.** 2000. Biotin Metabolism in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:17-47.
- Al-Feel W, Chirala SS, Wakil SJ.** 1992. Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4534-4538.
- Allison FE, Hoover SR, Burk D.** 1933. A Respiration Coenzyme. *Science* **78**:217-218.
- Allison FE, Hoover SR.** 1934. An Accessory Factor for Legume Nodule Bacteria: I. Sources and Activity. *J Bacteriol* **27**:561-581.
- Aoki Y, Suzuki Y, Li X, Sakamoto O, Chikaoka H, Takita S, Narisawa K.** 1997. Characterization of mutant holocarboxylase synthetase (HCS): a K_m for biotin was not elevated in a patient with HCS deficiency. *Pediatr Res* **42**:849-854.
- Arndt K, Fink GR.** 1986. GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:8516-8520.
- Athappilly FK, Hendrickson WA.** 1995. Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing. *Structure* **3**:1407-1419.
- Bagautdinov B, Kuroishi C, Sugahara M, Kunishima N.** 2005. Crystal structures of biotin protein ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its complexes: structural basis of biotin activation. *J Mol Biol* **353**:322-333.
- Bagautdinov B, Matsuura Y, Bagautdinova S, Kunishima N.** 2008. Protein biotinylation visualized by a complex structure of biotin protein ligase with a substrate. *J Biol Chem* **283**:14739-14750.
- Bai DH, Moon TW, Lopez-Casillas F, Andrews PC, Kim KH.** 1989. Analysis of the biotin-binding site on acetyl-CoA carboxylase from rat. *Eur J Biochem* **182**:239-245.
- Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, Polyak SW.** 2007. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem*.
- Barker DF, Campbell AM.** 1980. Use of bio-lac fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **143**:789-800.

- Barker DF, Campbell AM.** 1981a. The birA gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. *J Mol Biol* **146**:451-467.
- Barker DF, Campbell AM.** 1981b. Genetic and biochemical characterization of the birA gene and its product: evidence for a direct role of biotin holoenzyme synthetase in repression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **146**:469-492.
- Bässler K-H, Golly I, Loew D, Pietrzik K.** 2002. Vitamin-Lexikon, 3rd edn. München, Jena: Urban & Fischer.
- Becker JM, Wilchek M, Katchalski E.** 1971. Irreversible inhibition of biotin transport in yeast by biotinyl-p-nitrophenyl ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:2604-2607.
- Beckett D, Matthews BW.** 1997. *Escherichia coli* repressor of biotin biosynthesis. *Methods Enzymol* **279**:362-376.
- Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ.** 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* **8**:921-929.
- Beckett D.** 2007. Biotin Sensing: Universal Influence of Biotin Status on Transcription. *Annu Rev Genet.*
- Belli G, Molina MM, Garcia-Martinez J, Perez-Ortin JE, Herrero E.** 2004. *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J Biol Chem* **279**:12386-12395.
- Bender DA.** 2003. Nutritional biochemistry of the vitamins, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Berkovitch F, Nicolet Y, Wan JT, Jarrett JT, Drennan CL.** 2004. Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**:76-79.
- Blazquez MA, Gamo FJ, Gancedo C.** 1995. A mutation affecting carbon catabolite repression suppresses growth defects in pyruvate carboxylase mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **377**:197-200.
- Bower S, Perkins J, Yocum RR, Serron P, Sorokin A, Rahaim P, Howitt CL, Prasad N, Ehrlich SD, Pero J.** 1995. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* birA gene encoding a repressor of the biotin operon. *J Bacteriol* **177**:2572-2575.
- Bower S, Perkins JB, Yocum RR, Howitt CL, Rahaim P, Pero J.** 1996. Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon. *J Bacteriol* **178**:4122-4130.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD.** 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**:115-132.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brewster NK, Val DL, Walker ME, Wallace JC.** 1994. Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys* **311**:62-71.

- Brocklehurst SM, Perham RN.** 1993. Prediction of the three-dimensional structures of the biotinylated domain from yeast pyruvate carboxylase and of the lipoylated H-protein from the pea leaf glycine cleavage system: a new automated method for the prediction of protein tertiary structure. *Protein Sci* **2**:626-639.
- Burkholder PR.** 1943. Vitamin deficiencies in yeast. *Am J Bot* **30**:206-211.
- Carman GM, Han GS.** 2007. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. *Biochim Biophys Acta* **1771**:322-330.
- Caspari T, Robl I, Stolz J, Tanner W.** 1996. Purification of the *Chlorella* HUP1 hexose-proton symporter to homogeneity and its reconstitution in vitro. *Plant J* **10**:1045-1053.
- Chaiet L, Wolf FJ.** 1964. The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomycetes. *Arch Biochem Biophys* **106**:1-5.
- Chang HI, Cohen ND.** 1983. Regulation and intracellular localization of the biotin holocarboxylase synthetase of 3T3-L1 cells. *Arch Biochem Biophys* **225**:237-247.
- Chang WS, Peterson WH.** 1949. Factors Affecting the Biotin Content of Yeasts. *J Bacteriol* **58**:33-44.
- Chapman-Smith A, Turner DL, Cronan JE, Jr., Morris TW, Wallace JC.** 1994. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochem J* **302** (Pt 3):881-887.
- Chapman-Smith A, Cronan JE, Jr.** 1999a. In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomol Eng* **16**:119-125.
- Chapman-Smith A, Cronan JE, Jr.** 1999b. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* **24**:359-363.
- Chapman-Smith A, Cronan JE, Jr.** 1999c. Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr* **129**:477S-484S.
- Chapman-Smith A, Morris TW, Wallace JC, Cronan JE, Jr.** 1999. Molecular recognition in a post-translational modification of exceptional specificity. Mutants of the biotinylated domain of acetyl-CoA carboxylase defective in recognition by biotin protein ligase. *J Biol Chem* **274**:1449-1457.
- Che P, Weaver LM, Wurtele ES, Nikolau BJ.** 2003. The role of biotin in regulating 3-methylcrotonyl-coenzyme a carboxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**:1479-1486.
- Chen I, Choi YA, Ting AY.** 2007. Phage display evolution of a peptide substrate for yeast biotin ligase and application to two-color quantum dot labeling of cell surface proteins. *J Am Chem Soc* **129**:6619-6625.
- Chew YC, Camporeale G, Kothapalli N, Sarath G, Zempleni J.** 2006. Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase. *J Nutr Biochem* **17**:225-233.
- Chiba Y, Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Narisawa K.** 1994. Purification and properties of bovine liver holocarboxylase synthetase. *Arch Biochem Biophys* **313**:8-14.

- Chirala SS.** 1992. Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10232-10236.
- Chisholm VT, Lea HZ, Rai R, Cooper TG.** 1987. Regulation of allantoate transport in wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**:1684-1690.
- Choi-Rhee E, Cronan JE.** 2005. Biotin synthase is catalytic in vivo, but catalysis engenders destruction of the protein. *Chem Biol* **12**:461-468.
- Ciais D, Bohnsack MT, Tollervey D.** 2008. The mRNA encoding the yeast ARE-binding protein Cth2 is generated by a novel 3' processing pathway. *Nucleic Acids Res* **36**:3075-3084.
- Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M.** 2003. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* **301**:71-76.
- Cliften PF, Hillier LW, Fulton L, Graves T, Miner T, Gish WR, Waterston RH, Johnston M.** 2001. Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res* **11**:1175-1186.
- Consler TG, Persson BL, Jung H, Zen KH, Jung K, Prive GG, Verner GE, Kaback HR.** 1993. Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6934-6938.
- Cosper MM, Jameson GN, Davydov R, Eidsness MK, Hoffman BM, Huynh BH, Johnson MK.** 2002. The [4Fe-4S](2+) cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine. *J Am Chem Soc* **124**:14006-14007.
- Cosper MM, Jameson GN, Hernandez HL, Krebs C, Huynh BH, Johnson MK.** 2004. Characterization of the cofactor composition of *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **43**:2007-2021.
- Cronan JE, Jr.** 1988. Expression of the biotin biosynthetic operon of *Escherichia coli* is regulated by the rate of protein biotination. *J Biol Chem* **263**:10332-10336.
- Cronan JE, Jr.** 1989. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* **58**:427-429.
- Cronan JE, Jr.** 1990. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J Biol Chem* **265**:10327-10333.
- Cronan JE, Jr., Wallace JC.** 1995. The gene encoding the biotin-apoprotein ligase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **130**:221-229.
- Cronan JE, Jr., Reed KE.** 2000. Biotinylation of proteins in vivo: a useful posttranslational modification for protein analysis. *Methods Enzymol* **326**:440-458.
- Cronan JE, Jr., Waldrop GL.** 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res* **41**:407-435.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C.** 1968a. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* **46**:75-80.

- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C.** 1968b. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* **127**:17-21.
- Dakshinamurti K, Litvak S.** 1970. Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* **245**:5600-5605.
- Dakshinamurti K, Chauhan J.** 1988. Regulation of biotin enzymes. *Annu Rev Nutr* **8**:211-233.
- Dechant R, Peter M.** 2008. Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **20**:678-687.
- Deinert K, Fasiolo F, Hurt EC, Simos G.** 2001. Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem* **276**:6000-6008.
- Diamandis EP, Christopoulos TK.** 1991. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* **37**:625-636.
- du Vigneaud V.** 1942. The Structure of Biotin. *Science* **96**:455-461.
- Duntze W, Neumann D, Gancedo JM, Atzpodien W, Holzer H.** 1969. Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **10**:83-89.
- Dupuis L, Leon-Del-Rio A, Leclerc D, Campeau E, Sweetman L, Saudubray JM, Herman G, Gibson KM, Gravel RA.** 1996. Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet* **5**:1011-1016.
- Duval M, DeRose RT, Job C, Faucher D, Douce R, Job D.** 1994a. The major biotinyl protein from *Pisum sativum* seeds covalently binds biotin at a novel site. *Plant Mol Biol* **26**:265-273.
- Duval M, Job C, Alban C, Douce R, Job D.** 1994b. Developmental patterns of free and protein-bound biotin during maturation and germination of seeds of *Pisum sativum*: characterization of a novel seed-specific biotinylated protein. *Biochem J* **299** (Pt 1):141-150.
- Eakin RE, Snell EE, Williams RJ.** 1941. The concentration and assay of avidin, the injury-producing protein in raw egg white. *J Biol Chem* **140**:535-543.
- Eisenberg MA, Prakash O, Hsiung SC.** 1982. Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J Biol Chem* **257**:15167-15173.
- Entcheva P, Phillips DA, Streit WR.** 2002. Functional analysis of *Sinorhizobium meliloti* genes involved in biotin synthesis and transport. *Appl Environ Microbiol* **68**:2843-2848.
- Entian KD, Frohlich KU.** 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J Bacteriol* **158**:29-35.
- Escalettes F, Florentin D, Tse Sum Bui B, Lesage D, Marquet A.** 1999. Biotin Synthase Mechanism: Evidence for Hydrogen Transfer from the Substrate into Deoxyadenosine. *J Am Chem Soc* **121**:3571-3578.

- Fontecave M, Ollagnier-de-Choudens S, Mulliez E.** 2003. Biological radical sulfur insertion reactions. *Chem Rev* **103**:2149-2166.
- Gancedo JM.** 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* **206**:297-313.
- Genbauffe FS, Cooper TG.** 1986. Induction and repression of the urea amidolyase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **6**:3954-3964.
- Genbauffe FS, Cooper TG.** 1991. The urea amidolyase (DUR1,2) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Seq* **2**:19-32.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS.** 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**:737-741.
- Gietz RD, Sugino A.** 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527-534.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA.** 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**:355-360.
- Gietz RD, Woods RA.** 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**:87-96.
- Giots F, Donaton MC, Thevelein JM.** 2003. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **47**:1163-1181.
- Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mordant P, Saier MH, Jr.** 1997. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**:43-54.
- Gompel-Klein P, Brendel M.** 1990. Allelism of SNQ1 and ATR1, genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* required for controlling sensitivity to 4-nitroquinoline-N-oxide and aminotriazole. *Curr Genet* **18**:93-96.
- Gope ML, Keinanen RA, Kristo PA, Conneely OM, Beattie WG, Zarucki-Schulz T, O'Malley BW, Kulomaa MS.** 1987. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA. *Nucleic Acids Res* **15**:3595-3606.
- Grassl SM.** 1992a. Human placental brush-border membrane Na(+)-pantothenate cotransport. *J Biol Chem* **267**:22902-22906.
- Grassl SM.** 1992b. Human placental brush-border membrane Na(+)-biotin cotransport. *J Biol Chem* **267**:17760-17765.
- Green NM.** 1990. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* **184**:51-67.
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR et al.** 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**:731-740.

- Guillen-Navarro K, Araiza G, Garcia-de los Santos A, Mora Y, Dunn MF.** 2005a. The *Rhizobium etli* bioMNY operon is involved in biotin transport. *FEMS Microbiol Lett* **250**:209-219.
- Guillen-Navarro K, Encarnacion S, Dunn MF.** 2005b. Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* **246**:159-165.
- Hagele E, Neeff J, Mecke D.** 1978. The malate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterisation and studies on their regulation. *Eur J Biochem* **83**:67-76.
- Hall C, Dietrich FS.** 2007. The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene clustering. *Genetics* **177**:2293-2307.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J et al.** 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**:99-104.
- Harlow E, Lane D.** 1999. Using antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harris SA, Wolf DE, Mozingo R, Folkers K.** 1943. Synthetic Biotin. *Science* **97**:447-448.
- Hasslacher M, Ivessa AS, Paltauf F, Kohlwein SD.** 1993. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **268**:10946-10952.
- Hebbeln P, Rodionov DA, Alfandega A, Eitinger T.** 2007. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2909-2914.
- Heinz EB, Phillips DA, Streit WR.** 1999. BioS, a biotin-induced, stationary-phase, and possible LysR-type regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**:803-812.
- Henry SA, Patton-Vogt JL.** 1998. Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**:133-179.
- Hill DE, Hope IA, Macke JP, Struhl K.** 1986a. Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* **234**:451-457.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A.** 1986b. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163-167.
- Hinnebusch AG, Natarajan K.** 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **1**:22-32.
- Hoffman CS, Winston F.** 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272.

- Hoja U, Wellein C, Greiner E, Schweizer E.** 1998. Pleiotropic phenotype of acetyl-CoA-carboxylase-defective yeast cells--viability of a BPL1-amber mutation depending on its readthrough by normal tRNA(Gln)(CAG). *Eur J Biochem* **254**:520-526.
- Hoja U, Marthol S, Hofmann J, Stegner S, Schulz R, Meier S, Greiner E, Schweizer E.** 2004. HFA1 encoding an organelle-specific acetyl-CoA carboxylase controls mitochondrial fatty acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:21779-21786.
- Holmes DS, Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**:193-197.
- Holsbeeks I, Lagatie O, Van Nuland A, Van de Velde S, Thevelein JM.** 2004. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem Sci* **29**:556-564.
- Hope IA, Struhl K.** 1985. GCN4 protein, synthesized in vitro, binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell* **43**:177-188.
- Hoppen J, Repenning A, Albrecht A, Geburtig S, Schuller HJ.** 2005. Comparative analysis of promoter regions containing binding sites of the heterodimeric transcription factor Ino2/Ino4 involved in yeast phospholipid biosynthesis. *Yeast* **22**:601-613.
- Horecka J, Sprague GF, Jr.** 2000. Use of imidazoleglycerolphosphate dehydratase (His3) as a biological reporter in yeast. *Methods Enzymol* **326**:107-119.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK.** 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**:686-691.
- Hyde R, Taylor PM, Hundal HS.** 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J* **373**:1-18.
- Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B.** 1995. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* **56**:76-83.
- Hymes J, Wolf B.** 1996. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* **255**:1-11.
- Hymes J, Wolf B.** 1999. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* **129**:485S-489S.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Jameson GN, Cospier MM, Hernandez HL, Johnson MK, Huynh BH.** 2004. Role of the [2Fe-2S] cluster in recombinant *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **43**:2022-2031.
- Jander G, Cronan JE, Jr., Beckwith J.** 1996. Biotinylation in vivo as a sensitive indicator of protein secretion and membrane protein insertion. *J Bacteriol* **178**:3049-3058.
- Jarrett JT.** 2003. The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **7**:174-182.
- Jarrett JT.** 2005. The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase. *Arch Biochem Biophys* **433**:312-321.

- Jensen LT, Culotta VC.** 2000. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**:3918-3927.
- Jesch SA, Zhao X, Wells MT, Henry SA.** 2005. Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J Biol Chem* **280**:9106-9118.
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A, Cold Spring Harbor Laboratory.** 1994. Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual, 1994 edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kamiryo T, Parthasarathy S, Numa S.** 1976. Evidence that acyl coenzyme A synthetase activity is required for repression of yeast acetyl coenzyme A carboxylase by exogenous fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:386-390.
- Kanazawa S, Driscoll M, Struhl K.** 1988. ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol Cell Biol* **8**:664-673.
- Kaur J, Bachhawat AK.** 2007. Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**:877-890.
- Kearsey SE.** 1993. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene closely related to FAS3 (acetyl-CoA carboxylase). *DNA Seq* **4**:69-70.
- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES.** 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**:241-254.
- Kim HS, Hoja U, Stolz J, Sauer G, Schweizer E.** 2004. Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:42445-42452.
- Kim KH.** 1997. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* **17**:77-99.
- Kim KS, Rosenkrantz MS, Guarente L.** 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol* **6**:1936-1942.
- Klasson H, Fink GR, Ljungdahl PO.** 1999. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **19**:5405-5416.
- Klebl F, Zillig M, Sauer N.** 2000. Transcription of the yeast TNA1 gene is not only regulated by nicotinate but also by p-aminobenzoate. *FEBS Lett* **481**:86-87.
- Klotowski T, Wiater A.** 1965. Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Arch Biochem Biophys* **112**:562-566.
- Knowles JR.** 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **58**:195-221.
- Kögl F, Tönnis B.** 1936. Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. *Z physiol Chemie* **242**:43-73.
- Kondo H, Uno S, Komizo Y, Sunamoto J.** 1984. Importance of methionine residues in the enzymatic carboxylation of biotin-containing peptides representing the local biotinyl site of *E. coli* acetyl-CoA carboxylase. *Int J Pept Protein Res* **23**:559-564.

- Koser SA.** 1968. Vitamin requirements of bacteria and yeasts. Springfield, Ill.: Thomas.
- Kosow DP, Huang SC, Lane MD.** 1962. Propionyl holocarboxylase synthesis. I. Preparation and properties of the enzyme system. *J Biol Chem* **237**:3633-3639.
- Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zempleni J.** 2005. Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* **16**:446-448.
- Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, Piccirillo S, Umansky L, Drawid A, Jansen R, Liu Y *et al.*** 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* **16**:707-719.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lane MD, Rominger KL, Young DL, Lynen F.** 1964a. The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+)-Biotin. Ii. Investigation of the Reaction Mechanism. *J Biol Chem* **239**:2865-2871.
- Lane MD, Young DL, Lynen F.** 1964b. The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+)-Biotin. I. Purification of the Apoenzyme and Synthetase; Characteristics of the Reaction. *J Biol Chem* **239**:2858-2864.
- Langkjaer RB, Cliften PF, Johnston M, Piskur J.** 2003. Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature* **421**:848-852.
- Layer G, Heinz DW, Jahn D, Schubert WD.** 2004. Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **8**:468-476.
- Leon-Del-Rio A, Gravel RA.** 1994. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **269**:22964-22968.
- Leon-Del-Rio A, Leclerc D, Akerman B, Wakamatsu N, Gravel RA.** 1995. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4626-4630.
- Leonian LH, Lilly VG.** 1942. The effect of vitamins on ten strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Bot* **29**:459-464.
- Li SJ, Cronan JE, Jr.** 1992. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **267**:855-863.
- Lim F, Morris CP, Occhiodoro F, Wallace JC.** 1988. Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J Biol Chem* **263**:11493-11497.
- Ljungdahl PO.** 2009. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* **37**:242-247.
- Llorente B, Dujon B.** 2000. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DAL5 gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease TNA1 (YGR260w). *FEBS Lett* **475**:237-241.

- Lotierzo M, Tse Sum Bui B, Florentin D, Escalettes F, Marquet A.** 2005. Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem Soc Trans* **33**:820-823.
- Ludwig A, Stolz J, Sauer N.** 2000. Plant sucrose-H⁺ symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant J* **24**:503-509.
- Ma Q, Herschman HR.** 1995. The yeast homologue YTIS11, of the mammalian TIS11 gene family is a non-essential, glucose repressible gene. *Oncogene* **10**:487-494.
- MacIsaac KD, Wang T, Gordon DB, Gifford DK, Stormo GD, Fraenkel E.** 2006. An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**:113.
- Marger MD, Saier MH, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**:13-20.
- Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC.** 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* **356**:408-414.
- Marquet A, Bui BT, Florentin D.** 2001. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam Horm* **61**:51-101.
- Marshall-Carlson L, Celenza JL, Laurent BC, Carlson M.** 1990. Mutational analysis of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**:1105-1115.
- McAlister L, Holland MJ.** 1982. Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem* **257**:7181-7188.
- McAlister L, Holland MJ.** 1985. Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* **260**:15019-15027.
- McAllister HC, Coon MJ.** 1966. Further studies on the properties of liver propionyl coenzyme A holocarboxylase synthetase and the specificity of holocarboxylase formation. *J Biol Chem* **241**:2855-2861.
- McCollum EV, Kennedy C.** 1916. The dietary factors operating in the production of polyneuritis. *J Biol Chem* **24**:491-502.
- Melcher K, Sharma B, Ding WV, Nolden M.** 2000. Zero background yeast reporter plasmids. *Gene* **247**:53-61.
- Menendez J, Delgado J, Gancedo C.** 1998. Isolation of the *Pichia pastoris* PYC1 gene encoding pyruvate carboxylase and identification of a suppressor of the pyc phenotype. *Yeast* **14**:647-654.
- Menendez J, Gancedo C.** 1998. Regulatory regions in the promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* PYC1 and PYC2 genes encoding isoenzymes of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiol Lett* **164**:345-352.
- Mishina M, Roggenkamp R, Schweizer E.** 1980. Yeast mutants defective in acetyl-coenzyme A carboxylase and biotin: apocarboxylase ligase. *Eur J Biochem* **111**:79-87.
- Mock DM, Lankford GL, Cazin J, Jr.** 1993. Biotin and biotin analogs in human urine: biotin accounts for only half of the total. *J Nutr* **123**:1844-1851.

- Mock DM, Lankford GL, Mock NI.** 1995. Biotin accounts for only half of the total avidin-binding substances in human serum. *J Nutr* **125**:941-946.
- Morris CP, Lim F, Wallace JC.** 1987. Yeast pyruvate carboxylase: gene isolation. *Biochem Biophys Res Commun* **145**:390-396.
- Mühlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R.** 2002. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* **277**:29810-29816.
- Mühlenhoff U, Gerl MJ, Flauger B, Pirner HM, Balser S, Richhardt N, Lill R, Stolz J.** 2007. The iron-sulfur cluster proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**:495-504.
- Mukhopadhyay B, Purwantini E, Kreder CL, Wolfe RS.** 2001. Oxaloacetate synthesis in the methanarchaeon *Methanosarcina barkeri*: pyruvate carboxylase genes and a putative *Escherichia coli*-type bifunctional biotin protein ligase gene (*bpl/birA*) exhibit a unique organization. *J Bacteriol* **183**:3804-3810.
- Murtif VL, Samols D.** 1987. Mutagenesis affecting the carboxyl terminus of the biotinyl subunit of transcarboxylase. Effects on biotinylation. *J Biol Chem* **262**:11813-11816.
- Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA.** 2004. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet* **13**:15-23.
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ.** 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**:4347-4368.
- Naumov G, Turakainen H, Naumova E, Aho S, Korhola M.** 1990. A new family of polymorphic genes in *Saccharomyces cerevisiae*: alpha-galactosidase genes MEL1-MEL7. *Mol Gen Genet* **224**:119-128.
- Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis EJ, Roberts IN.** 2000. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 5**:1931-1942.
- Nelissen B, De Wachter R, Goffeau A.** 1997. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**:113-134.
- Ohsugi M, Imanishi Y.** 1985. Microbiological activity of biotin-vitimers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **31**:563-572.
- Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Hewitson KS, Roach P, Munck E, Fontecave M.** 2002. Reductive cleavage of S-adenosylmethionine by biotin synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:13449-13454.
- Ollagnier-de-Choudens S, Mulliez E, Fontecave M.** 2002a. The PLP-dependent biotin synthase from *Escherichia coli*: mechanistic studies. *FEBS Lett* **532**:465-468.

- Ollagnier-de-Choudens S, Mulliez E, Hewitson KS, Fontecave M.** 2002b. Biotin synthase is a pyridoxal phosphate-dependent cysteine desulfurase. *Biochemistry* **41**:9145-9152.
- O'Regan M, Gloeckler R, Bernard S, Ledoux C, Ohsawa I, Lemoine Y.** 1989. Nucleotide sequence of the bioH gene of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **17**:8004.
- Osmani SA, Scrutton MC, Mayer F.** 1985. The structure and regulation of fungal pyruvate carboxylases. *Ann N Y Acad Sci* **447**:56-71.
- Otsuka A, Abelson J.** 1978. The regulatory region of the biotin operon in Escherichia coli. *Nature* **276**:689-694.
- Otsuka AJ, Buoncristiani MR, Howard PK, Flamm J, Johnson C, Yamamoto R, Uchida K, Cook C, Ruppert J, Matsuzaki J.** 1988. The Escherichia coli biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the bio operon. *J Biol Chem* **263**:19577-19585.
- Ozcan S, Dover J, Johnston M.** 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J* **17**:2566-2573.
- Ozimek P, van Dijk R, Latchev K, Gancedo C, Wang DY, van der Klei IJ, Veenhuis M.** 2003. Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol Biol Cell* **14**:786-797.
- Ozimek P, Kotter P, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 2006. Hansenula polymorpha and Saccharomyces cerevisiae Pex5p's recognize different, independent peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase. *FEBS Lett* **580**:46-50.
- Ozimek PZ, Klompmaker SH, Visser N, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 2007. The transcarboxylase domain of pyruvate carboxylase is essential for assembly of the peroxisomal flavoenzyme alcohol oxidase. *FEMS Yeast Res* **7**:1082-1092.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Del Rio AL.** 2002. Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res* **33**:439-447.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Gravel RA, Cervantes-Roldan R, Velazquez A, Leon-Del-Rio A.** 2004. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J Biol Chem* **279**:52312-52318.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1-34.
- Parrott MB, Barry MA.** 2000. Metabolic biotinylation of recombinant proteins in mammalian cells and in mice. *Mol Ther* **1**:96-104.
- Pasteur L.** 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Ann Chim Phys* **58**:323-426.
- Pelzer W, Muhlenhoff U, Diekert K, Siegmund K, Kispal G, Lill R.** 2000. Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* **476**:134-139.
- Peng G, Hopper JE.** 2000. Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **20**:5140-5148.

- Penzlin H.** 2006. Sir Frederick Gowland Hopkins begründet die moderne Vitaminforschung. *Biol Unserer Zeit* **3**:192-193.
- Phalip V, Kuhn I, Lemoine Y, Jeltsch JM.** 1999. Characterization of the biotin biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and evidence for a cluster containing BIO5, a novel gene involved in vitamin uptake. *Gene* **232**:43-51.
- Piffeteau A, Gaudry M.** 1985. Biotin uptake: influx, efflux and countertransport in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* **816**:77-82.
- Pirner HM, Stolz J.** 2006. Biotin Sensing in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mediated by a Conserved DNA Element and Requires the Activity of Biotin-Protein Ligase. *J Biol Chem* **281**:12381-12389.
- Platt A, Reece RJ.** 1998. The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J* **17**:4086-4091.
- Polyak SW, Chapman-Smith A, Brautigan PJ, Wallace JC.** 1999. Biotin protein ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. The N-terminal domain is required for complete activity. *J Biol Chem* **274**:32847-32854.
- Polyak SW, Chapman-Smith A, Mulhern TD, Cronan JE, Jr., Wallace JC.** 2001. Mutational analysis of protein substrate presentation in the post-translational attachment of biotin to biotin domains. *J Biol Chem* **276**:3037-3045.
- Prakash O, Eisenberg MA.** 1974. Active transport of biotin in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **120**:785-791.
- Prakash O, Eisenberg MA.** 1979. Biotinyl 5'-adenylate: corepressor role in the regulation of the biotin genes of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5592-5595.
- Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V.** 1997. Characterization of a sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipolate in human placental choriocarcinoma cells. *Placenta* **18**:527-533.
- Prasad PD, Wang H, Kekuda R, Fujita T, Fei YJ, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V.** 1998. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipolate. *J Biol Chem* **273**:7501-7506.
- Prasad PD, Wang H, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V.** 1999. Molecular and functional characterization of the intestinal Na⁺-dependent multivitamin transporter. *Arch Biochem Biophys* **366**:95-106.
- Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP.** 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**:1607-1633.
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ.** 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**:99-110.
- Puyaubert J, Denis L, Alban C.** 2008. Dual targeting of Arabidopsis holocarboxylase synthetase1: a small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting. *Plant Physiol* **146**:478-491.

- Rai R, Genbauffe F, Lea HZ, Cooper TG.** 1987. Transcriptional regulation of the DAL5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**:3521-3524.
- Rebeille F, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S, Douce R.** 2007. The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynth Res* **92**:149-162.
- Reche P, Li YL, Fuller C, Eichhorn K, Perham RN.** 1998. Selectivity of post-translational modification in biotinylated proteins: the carboxy carrier protein of the acetyl-CoA carboxylase of *Escherichia coli*. *Biochem J* **329 (Pt 3)**:589-596.
- Reddy DV, Shenoy BC, Carey PR, Sonnichsen FD.** 2000. High resolution solution structure of the 1.3S subunit of transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochemistry* **39**:2509-2516.
- Reed KE, Cronan JE, Jr.** 1991. *Escherichia coli* exports previously folded and biotinated protein domains. *J Biol Chem* **266**:11425-11428.
- Reidling JC, Nabokina SM, Said HM.** 2007. Molecular mechanisms involved in the adaptive regulation of human intestinal biotin uptake: A study of the hSMVT system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**:G275-281.
- Rickey TM, Lewin AS.** 1986. Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast. *Mol Cell Biol* **6**:488-493.
- Roberts EL, Shu N, Howard MJ, Broadhurst RW, Chapman-Smith A, Wallace JC, Morris T, Cronan JE, Jr., Perham RN.** 1999. Solution structures of apo and holo biotinyl domains from acetyl coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* determined by triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **38**:5045-5053.
- Robzyk K, Kassir Y.** 1992. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**:3790.
- Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS.** 2002. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea. *Genome Res* **12**:1507-1516.
- Rodionov DA, Gelfand MS.** 2006. Computational identification of BioR, a transcriptional regulator of biotin metabolism in Alphaproteobacteria, and of its binding signal. *FEMS Microbiol Lett* **255**:102-107.
- Rodriguez-Melendez R, Lewis B, McMahon RJ, Zempleni J.** 2003. Diaminobiotin and desthiobiotin have biotin-like activities in Jurkat cells. *J Nutr* **133**:1259-1264.
- Rodriguez-Melendez R, Zempleni J.** 2003. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* **14**:680-690.
- Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zempleni J.** 2006. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* **17**:23-30.
- Rogers TO, Lichstein HC.** 1969a. Regulation of biotin transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **100**:565-572.
- Rogers TO, Lichstein HC.** 1969b. Characterization of the biotin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **100**:557-564.

- Rohde M, Lim F, Wallace JC.** 1991. Electron microscopic localization of pyruvate carboxylase in rat liver and *Saccharomyces cerevisiae* by immunogold procedures. *Arch Biochem Biophys* **290**:197-201.
- Rutherford JC, Jaron S, Winge DR.** 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem* **278**:27636-27643.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF.** 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samols D, Thornton CG, Murtif VL, Kumar GK, Haase FC, Wood HG.** 1988. Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J Biol Chem* **263**:6461-6464.
- Santiago TC, Mamoun CB.** 2003. Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *J Biol Chem* **278**:38723-38730.
- Schatz PJ.** 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **11**:1138-1143.
- Schneider G, Lindqvist Y.** 2001. Structural enzymology of biotin biosynthesis. *FEBS Lett* **495**:7-11.
- Schneiter R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD, Tartakoff AM.** 1996. A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol* **16**:7161-7172.
- Schüller HJ, Richter K, Hoffmann B, Ebbert R, Schweizer E.** 1995. DNA binding site of the yeast heteromeric Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix transcription factor: structural requirements as defined by saturation mutagenesis. *FEBS Lett* **370**:149-152.
- Sega GA.** 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* **134**:113-142.
- Sellick CA, Reece RJ.** 2005. Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem Sci* **30**:405-412.
- Shakoury-Elizeh M, Tiedeman J, Rashford J, Ferea T, Demeter J, Garcia E, Rolfes R, Brown PO, Botstein D, Philpott CC.** 2004. Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**:1233-1243.
- Shenoy BC, Paranjape S, Murtif VL, Kumar GK, Samols D, Wood HG.** 1988. Effect of mutations at Met-88 and Met-90 on the biotinylation of Lys-89 of the apo 1.3S subunit of transcarboxylase. *Faseb J* **2**:2505-2511.
- Shiuan D, Wu CH, Chang YS, Chang RJ.** 1997. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for biotin. *Methods Enzymol* **279**:321-326.
- Siddiqui AH, Brandriss MC.** 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol Cell Biol* **9**:4706-4712.

- Sikorski RS, Hieter P.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.
- Simos G, Segref A, Fasiolo F, Hellmuth K, Shevchenko A, Mann M, Hurt EC.** 1996. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **15**:5437-5448.
- Solorzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A.** 2002. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5325-5330.
- Stanley CM, Hymes J, Wolf B.** 2004. Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase. *Mol Genet Metab* **81**:300-312.
- Stanley JS, Griffin JB, Zempleni J.** 2001. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* **268**:5424-5429.
- Stolz J, Ludwig A, Sauer N.** 1998. Bacteriophage lambda surface display of a bacterial biotin acceptor domain reveals the minimal peptide size required for biotinylation. *FEBS Lett* **440**:213-217.
- Stolz J, Hoja U, Meier S, Sauer N, Schweizer E.** 1999. Identification of the plasma membrane H⁺-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *J Biol Chem* **274**:18741-18746.
- Stolz J, Sauer N.** 1999. The fenpropimorph resistance gene FEN2 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. *J Biol Chem* **274**:18747-18752.
- Stolz J.** 2003. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**:221-231.
- Stolz J, Vielreicher M.** 2003. Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:18990-18996.
- Stolz J, Caspari T, Carr AM, Sauer N.** 2004. Cell division defects of *Schizosaccharomyces pombe* *liz1*- mutants are caused by defects in pantothenate uptake. *Eukaryot Cell* **3**:406-412.
- Stoner GL, Eisenberg MA.** 1975. Purification and properties of 7, 8-diaminopelargonic acid aminotransferase. *J Biol Chem* **250**:4029-4036.
- Streaker ED, Beckett D.** 2006a. Nonenzymatic biotinylation of a biotin carboxyl carrier protein: unusual reactivity of the physiological target lysine. *Protein Sci* **15**:1928-1935.
- Streaker ED, Beckett D.** 2006b. The biotin regulatory system: kinetic control of a transcriptional switch. *Biochemistry* **45**:6417-6425.
- Streit WR, Entcheva P.** 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:21-31.

- Struhl K, Davis RW.** 1977. Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerolphosphate dehydratase (his3). *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5255-5259.
- Struhl K.** 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu Rev Biochem* **58**:1051-1077.
- Stucka R, Dequin S, Salmon JM, Gancedo C.** 1991. DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol Gen Genet* **229**:307-315.
- Sumrada RA, Cooper TG.** 1982. Urea carboxylase and allophanate hydrolase are components of a multifunctional protein in yeast. *J Biol Chem* **257**:9119-9127.
- Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niikawa N, Matsubara Y, Narisawa K.** 1994. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nat Genet* **8**:122-128.
- Taroni F, Rosenberg LE.** 1991. The precursor of the biotin-binding subunit of mammalian propionyl-CoA carboxylase can be translocated into mitochondria as apo- or holoprotein. *J Biol Chem* **266**:13267-13271.
- Taylor AM, Farrar CE, Jarrett JT.** 2008. 9-Mercaptodethiobiotin is formed as a competent catalytic intermediate by *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **47**:9309-9317.
- te Heesen S, Janetzky B, Lehle L, Aebi M.** 1992. The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity in vivo and in vitro. *EMBO J* **11**:2071-2075.
- te Heesen S, Knauer R, Lehle L, Aebi M.** 1993. Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *EMBO J* **12**:279-284.
- Thomas BJ, Rothstein R.** 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**:619-630.
- Thompson MJ, Lai WS, Taylor GA, Blackshear PJ.** 1996. Cloning and characterization of two yeast genes encoding members of the CCHC class of zinc finger proteins: zinc finger-mediated impairment of cell growth. *Gene* **174**:225-233.
- Tissot G, Job D, Douce R, Alban C.** 1996. Protein biotinylation in higher plants: characterization of biotin holocarboxylase synthetase activity from pea (*Pisum sativum*) leaves. *Biochem J* **314** (Pt 2):391-395.
- Tissot G, Douce R, Alban C.** 1997. Evidence for multiple forms of biotin holocarboxylase synthetase in pea (*Pisum sativum*) and in *Arabidopsis thaliana*: subcellular fractionation studies and isolation of a cDNA clone. *Biochem J* **323** (Pt 1):179-188.
- Tissot G, Pepin R, Job D, Douce R, Alban C.** 1998. Purification and properties of the chloroplastic form of biotin holocarboxylase synthetase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **258**:586-596.
- Todd RB, Andrianopoulos A.** 1997. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**:388-405.

- Toh H, Kondo H, Tanabe T.** 1993. Molecular evolution of biotin-dependent carboxylases. *Eur J Biochem* **215**:687-696.
- Tse Sum Bui B, Florentin D, Fournier F, Ploux O, Mejean A, Marquet A.** 1998. Biotin synthase mechanism: on the origin of sulphur. *FEBS Lett* **440**:226-230.
- Tse Sum Bui B, Lotierzo M, Escalettes F, Florentin D, Marquet A.** 2004. Further investigation on the turnover of *Escherichia coli* biotin synthase with dethiobiotin and 9-mercaptopdethiobiotin as substrates. *Biochemistry* **43**:16432-16441.
- Tse Sum Bui B, Mattioli TA, Florentin D, Bolbach G, Marquet A.** 2006. *Escherichia coli* biotin synthase produces selenobiotin. Further evidence of the involvement of the [2Fe-2S]₂⁺ cluster in the sulfur insertion step. *Biochemistry* **45**:3824-3834.
- Turoscy V, Cooper TG.** 1987. Ureidosuccinate is transported by the allantate transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**:2598-2600.
- Ugulava NB, Gibney BR, Jarrett JT.** 2001. Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry* **40**:8343-8351.
- Val DL, Chapman-Smith A, Walker ME, Cronan JE, Jr., Wallace JC.** 1995. Polymorphism of the yeast pyruvate carboxylase 2 gene and protein: effects on protein biotinylation. *Biochem J* **312** (Pt 3):817-825.
- Vergara SV, Thiele DJ.** 2008. Post-transcriptional regulation of gene expression in response to iron deficiency: co-ordinated metabolic reprogramming by yeast mRNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **36**:1088-1090.
- Vidal A, Abril N, Pueyo C.** 1995. DNA repair by Ogt alkyltransferase influences EMS mutational specificity. *Carcinogenesis* **16**:817-821.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1793-1808.
- Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, Rebischung C, Philippsen P.** 1997. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1065-1075.
- Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC.** 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* **52**:537-579.
- Walker JR, Altman E.** 2005. Biotinylation facilitates the uptake of large peptides by *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**:1850-1855.
- Walker ME, Val DL, Rohde M, Devenish RJ, Wallace JC.** 1991. Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **176**:1210-1217.
- Wang H, Huang W, Fei YJ, Xia H, Yang-Feng TL, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD.** 1999. Human placental Na⁺-dependent multivitamin transporter. Cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **274**:14875-14883.

- Wang T, Stormo GD.** 2003. Combining phylogenetic data with co-regulated genes to identify regulatory motifs. *Bioinformatics* **19**:2369-2380.
- Weaver LH, Kwon K, Beckett D, Matthews BW.** 2001. Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6045-6050.
- Weider M.** 2006. Identifizierung von *cis*- und *trans*-Komponenten der biotinabhängigen Transkriptionsregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation, Lehrstuhl für Botanik II / Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen-Nürnberg*.
- Weider M, Machnik A, Klebl F, Sauer N.** 2006. Vhr1p, a New Transcription Factor from Budding Yeast, Regulates Biotin-dependent Expression of VHT1 and BIO5. *J Biol Chem* **281**:13513-13524.
- White HB, 3rd, Whitehead CC.** 1987. Role of avidin and other biotin-binding proteins in the deposition and distribution of biotin in chicken eggs. Discovery of a new biotin-binding protein. *Biochem J* **241**:677-684.
- Wickerham LJ.** 1946. A Critical Evaluation of the Nitrogen Assimilation Tests Commonly Used in the Classification of Yeasts. *J Bacteriol* **52**:293-301.
- Wickerham LJ, Burton KA.** 1948. Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeasts. *J Bacteriol* **56**:363-371.
- Wiedmann S, Eudy JD, Zempleni J.** 2003. Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* **133**:716-719.
- Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J.** 2004. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* **15**:433-439.
- Wilchek M, Bayer EA.** 1988. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem* **171**:1-32.
- Wildiers E.** 1901. Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. *La Cellule* **18**:313-332.
- Wilson KP, Shewchuk LM, Brennan RG, Otsuka AJ, Matthews BW.** 1992. Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9257-9261.
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ.** 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**:1359-1367.
- Wolf B, Jensen K.** 2005. Evolutionary conservation of biotinidase: implications for the enzyme's structure and subcellular localization. *Mol Genet Metab* **86**:44-50.
- Wolfe KH, Shields DC.** 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**:708-713.
- Wood HG, Barden RE.** 1977. Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem* **46**:385-413.

- Wood ZA, Weaver LH, Brown PH, Beckett D, Matthews BW.** 2006. Co-repressor induced order and biotin repressor dimerization: a case for divergent followed by convergent evolution. *J Mol Biol* **357**:509-523.
- Wu H, Ito K, Shimoi H.** 2005. Identification and characterization of a novel biotin biosynthesis gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**:6845-6855.
- Wu SC, Wong SL.** 2004. Development of an enzymatic method for site-specific incorporation of desthiobiotin to recombinant proteins in vitro. *Anal Biochem* **331**:340-348.
- Xia WL, Zhang J, Ahmad F.** 1994. Biotin holocarboxylase synthetase: purification from rat liver cytosol and some properties. *Biochem Mol Biol Int* **34**:225-232.
- Xu Y, Beckett D.** 1994. Kinetics of biotinyl-5'-adenylate synthesis catalyzed by the *Escherichia coli* repressor of biotin biosynthesis and the stability of the enzyme-product complex. *Biochemistry* **33**:7354-7360.
- Xue C, Hsueh YP, Heitman J.** 2008. Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev* **32**:1010-1032.
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klausner RD.** 1995. AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**:1231-1239.
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD.** 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J* **15**:3377-3384.
- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R.** 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**:18914-18918.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Yao X, Wei D, Soden C, Jr., Summers MF, Beckett D.** 1997. Structure of the carboxy-terminal fragment of the apo-biotin carboxyl carrier subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry* **36**:15089-15100.
- Zempleni J.** 2005. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* **25**:175-196.
- Zhang S, Sanyal I, Bulboaca GH, Rich A, Flint DH.** 1994. The gene for biotin synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and complementation of *Escherichia coli* strains lacking biotin synthase. *Arch Biochem Biophys* **309**:29-35.

7 Eigene Publikationen

Pirner HM, Stolz J: Biotin Sensing in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mediated by a Conserved DNA Element and Requires the Activity of Biotin-Protein Ligase. *J Biol Chem* 2006, **281**:12381-12389.

Mühlenhoff U, Gerl MJ, Flaeger B, Pirner HM, Balser S, Richhardt N, Lill R, Stolz J: The Iron-Sulfur Cluster Proteins Isa1 and Isa2 Are Required for the Function but Not for the De Novo Synthesis of the Fe/S Clusters of Biotin Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:495-504.

In der Publikation [Pirner und Stolz, 2006] wurde ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit veröffentlicht.

Anhang

BHB-Klon	Spore	Ura ⁺	Leu ⁺	AT-Resistenz	Paarungstyp
2	1A	+	+	+	a
	1B	-	+	+	α
	1H	-	+	+	a
	8G	+	+	+	α
8	1C	+	+	+	α
	3A	-	+	+	a
	3F	+	+	+	a
	4F	-	+	+	α
24	3E	+	+	+	a
	3H	+	+	+	α
	5G	-	+	+	a
	5H	-	+	+	α
57	4E	-	+	+	a
	5E	+	+	+	α
	5H	+	+	+	a
71	5B	+	+	+	a
	5C	+	+	+	α
	6D	-	+	+	a
	7C	-	+	+	α
76	1D	-	+	+	a
	3A	+	+	+	α
	6B	+	+	+	a
	8F	-	+	+	α
81	3B	+	+	+	α
	1F	+	+	+	a
	5G	-	+	+	α
	6G	-	+	+	a
90	6F	-	+	+	α
	6G	-	+	+	a
	7F	+	+	+	α
	7G	+	+	+	a
95	1G	+	+	+	α
	3E	+	+	+	a
	4E	-	+	+	a
	4'F	-	+	+	a
	5F	+	+	+	a

Anhang 1: Phänotypen der BHB-Sporen nach Rückkreuzung. Aufgeführt sind die Phänotypen der BHB-Sporen, die in Dauerkultur genommen worden sind. Hierbei wurden nur Sporen aus Tetraden mit einer 2:2 Ura⁺- und 2:2 Leu⁺-Verteilung berücksichtigt. AT-Resistenz + = Sporen können auf histidinfreien Minimalmedium-Platten mit 20 mM AT wachsen.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Jürgen Stolz für seine sehr gute Betreuung. Er gab mir viele Anregungen und praktische Tipps, zeigte immer Interesse und nahm sich auch in stressigen Phasen Zeit für fachliche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Widmar Tanner danke ich für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Lösungsvorschläge bei unseren Laborseminaren und das gute Klima, das an seinem Lehrstuhl herrschte. Die Ausflüge, Feste, Skiurlaube und Weihnachtsfeiern haben sicherlich dazu beigetragen.

Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden. Dr. Petra Reihl war mir eine gute Laborpartnerin, mit der man viel Spaß haben konnte und die viele unglaubliche Geschichten kannte. Außerdem konnte man mit ihr alle wichtigen und unwichtigen Fragen des Lebens diskutieren. Dr. Christian Vogl war immer eine Quelle guter Tipps und Dr. Guido Großmann und Stefan Ringlstetter danke ich für die hilfreichen Kommentare bezüglich dieses Skripts. Guido war außerdem immer ein guter Ansprechpartner bei Computerproblemen und hat natürlich auch sonst gerne Fragen beantwortet und Stefan Ringlstetter hat mich während meiner Schreibphase immer wieder auf interessante neue Artikel aufmerksam gemacht.

Weiterhin möchte ich allen Diplomanden und Praktikanten der Arbeitsgruppe Stolz danken, vor allem Sandra Balser und Mathias Gerl, die auch beide das Biotinthema bearbeitet haben, Andrea Spitzner, die voller Energie sprühte, und Susanne Schiffner, die mich beim Klonieren von Vektoren unterstützt hat.

Sabine Laberer und Petra Schitko gilt großer Dank für ihren engagierten Einsatz und ihre hilfreiche Unterstützung im Laboralltag. Besonders möchte ich auch Roland Donhauser danken, der mir ein paar Monate bei meiner Arbeit geholfen hat.

Danken möchte ich auch den anderen Arbeitsgruppen des Lehrstuhls, insbesondere den Mitgliedern der AG von Herrn Prof. Ludwig Lehle, denen man gerne mal einen Besuch abstatten und sich von ihnen das eine oder andere Enzym leihen konnte.

Vroni Mrosek danke ich für ihre organisatorischen Hilfen, Günther Peissig für die Blumen, Pflanzentipps und Dienstagskuchen, Monika Kammerer für ihre Hilfe beim Vorbereiten des Praktikums, Ingrid Fuchs für das mehrmalige Retten des Autoklaven und des darin befindlichen Inhalts, und dem Rest der Mannschaft für die vielen kleinen Handgriffe, die nötig sind einen Lehrstuhl am laufen zu halten.

Dem Lehrstuhl von Prof. Armin Kurtz danke ich dafür, dass ich dort meine ELISA-Tests durchführen konnte.

Besonderer Dank gilt Dr. Sandra Schlee, die sogar kurz vor Weihnachten bereit war meine Arbeit Korrektur zu lesen, und Dr. Simone Popp und Sylvia Thomas, bei denen ich jederzeit meinen Frust und meine Sorgen abladen konnte und immer wieder aufgebaut wurde.

Meiner Schwiegermutter Hedwig Stürer möchte ich danken, da sie den Weg von Vöhringen nach Regensburg nicht scheute, um uns gerne bei der Betreuung unseres Kindes zu helfen.

Großer Dank gilt vor allem auch meinen Eltern Ilona und Karl Pirner, die mich immer unterstützt haben, im Notfall schnell Hilfe anboten und sich ebenfalls wundervoll um den Kleinen kümmerten.

Dank möchte ich auch meinem Sohn Jakob aussprechen, der uns viel Lebensfreude und Glück spendet. Er ließ mich nicht einrosten und sorgte ganz automatisch für Pausen bei der Arbeit.

Großen Dank verdient nicht zuletzt mein Mann Michael, der mir viel Mut und Liebe gibt und mich in allen Lebenslagen unterstützte. Außerdem möchte ich ihm meine Achtung aussprechen, dass er sich von seiner schweren Krankheit nicht unterkriegen läßt und weiter für seine Genesung kämpft.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 23. Februar 2009