Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ceramidsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Stefan Schorling

aus

Hannover

2001

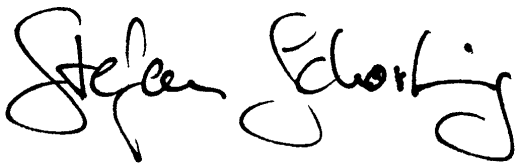
Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 10.01.2001



Dissertation eingereicht am: 10.01.2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schorling, S., Vallée, B., Riezman, H., and Oesterhelt, D. (2000) Ceramide synthase activity is dependent on Lag1p and Dgt1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem*., 381, (suppl.) S141

Schorling, S., Vallée, B., Barz, W.P., Riezman, H., and Oesterhelt, D. (2000) Lag1p and Dgt1p are essential for the acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction. *J. Biol. Chem.*, *eingereicht*

In Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Hallstrom, T.C., Lambert, L., Schorling, S., Balzi, E., Goffeau, G., and Moye-Rowley, W.S.. Coordinate control of sphingolipid biosynthesis and multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.

Schorling, S., Schmidt, E.K., Barz, W.P., and Oesterhelt, D.. Lag1p and Dgt1p are part of a multimeric complex in the ER membrane required for acyl-CoA-dependent ceramide synthase.

Schorling, S., Schmidt. E.K., Oesterhelt, D.. Ceramide facilitates survival of yeast cells after heat shock or at 37 °C.

Für Christine und meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS:

1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY 6 / 8

2. EINLEITUNG 10

2.1. Biosynthese von Sphingolipiden 11

2.2. Abbau von Sphingolipiden 17

2.3. Funktion von Sphingolipiden 19

2.3.1. Sphingolipide im Membranaufbau 19

2.3.2. Transport GPI-verankerter Proteine 20

2.3.3. Die Rolle von Ceramid in der Signaltransduktion 23

2.3.4. Weitere Funktionen von Sphingolipiden 27

2.4. Vorarbeiten und Zielsetzung 29

3. ERGEBNISSE 31

3.1. Allgemeine Charakterisierung von Lag1p und Dgt1p 31

3.1.1. Lag1p und Dgt1p sind konserviert in höheren Eukaryonten 31

3.1.2. Der N-Terminus von Dgt1p ist cytosolisch orientiert 37

3.1.3. Der C-Terminus und nicht der N-Terminus von Dgt1p ist funktionell bedeutsam 41

3.1.4. Dgt1p residiert ausschließlich in der ER-Membran 43

3.1.5. Lag1p und Dgt1p interagieren in der ER-Membran 46

3.2. Die Funktion von Lag1p und Dgt1p in der Biosynthese von Sphingolipiden 51

3.2.1. Die Syntheserate inositolhaltiger Sphingolipide ist drastisch reduziert in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* 51

3.2.2. *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen besitzen reduzierte Mengen inositolhaltiger Sphingolipide 54

3.2.3. IPCerS-Aktivität ist in *lag1*Δ*dgt1*Δ vorhanden 55
3.2.4. Die Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* führt zu einer Akkumulation von Sphingoidbasen 57
3.2.5. Lag1p und Dgt1p sind essentiell für den Einbau von exogenen Dihydrosphingosin in Ceramid *in vivo* 60
3.2.6. *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen sind resistent gegenüber Fumonisin B1 63
3.2.7. Die Fettsäureelongation ist nicht reduziert in *lag1*Δ*dgt1*Δ 65
3.2.8. Überexpression von *LAG1* und *DGT1* beeinflußt nicht die Ceramidsynthese *in vivo* 67
3.2.9. Lag1p und Dgt1p sind ein essentieller Bestandteil der CerS-Reaktion *in vitro* 69

3.3. Die Funktion von Ypc1p und Ydc1p als Suppressoren der *lag1*D*dgt1*D-Doppeldeletion 72
3.3.1. Überexpression von *YPC1* und *YDC1* erhöht die Syntheserate komplexer Sphingolipide in *lag1*Δ*dgt1*Δ 73
3.3.2. *YPC1*- und *YDC1*-supprimierte *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen besitzen erhöhte Mengen komplexer Sphingolipide 75
3.3.3. Der Einbau von exogenem DHS in Ceramid ist unabhängig von Ypc1p und Ydc1p 77
3.3.4. Die zusätzliche Deletion von *YPC1* und *YDC1* in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen inhibiert die Sphingolipidsynthese komplett 78
3.3.5. Ceramid ist für das Überleben der Zellen bei erhöhten Temperaturen oder nach Hitzeschock essentiell 80

4. DISKUSSION 83

4.1. Lag1p und Dgt1p: Essentielle Bestandteile der CerS 83

4.2. Mögliche Funktionen für Lag1p und Dgt1p 85
4.2.1. Sind Lag1p und Dgt1p katalytisch aktiv? 85
4.2.2. Regulieren Lag1p und Dgt1p die CerS-Aktivität? 85
4.2.3. Wirken Lag1p und Dgt1p substrataktivierend? 86

4.3. Ceramid und der Transport GPI-verankerter Proteine 88

4.4. Ceramid und Hitzestress 90

4.5. Ist Ceramid essentiell ? 93

5. MATERIAL UND METHODEN 96

5.1. Material 96

5.1.1. Chemikalien und Enzyme 96

5.1.2. Radioisotope 96

5.1.3. Puffer 96

5.1.4. Kultivierungsmedien 98

5.1.5. Verwendete Stämme 100

5.1.6. Verwendete Plasmide 101

5.1.7. Verwendete Oligonukleotide 102

5.1.8. Verwendete Antikörper 102

5.2. Mikrobiologische Methoden 103

5.2.1. Kultivierung und Anzucht von *S. cerevisiae* 103

5.2.2. Transformation von *S. cerevisiae* 104

5.2.3. Radioaktive *in vivo*-Pulsmarkierung von *S. cerevisiae* 104

5.2.4. Radioaktive *in vivo*-Langzeitmarkierung von *S. cerevisiae* 105

5.2.5. Standardmethoden zum Arbeiten mit *E. coli* 105

5.3. Molekularbiologische Methoden 105

5.3.1. Enzymatische Modifikation von DNA 105

5.3.2. Agarose-Gelelektrophorese 106

5.3.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 107

5.3.4. Polymerasekettenreaktion 107

5.3.5. DNA-Sequenzierung 108

5.3.6. Plasmidisolierung aus *E. coli*-Stämmen 109

5.3.7. Klonierung von pSTS30 und Derivaten 109

5.3.8. Klonierung von pRW12, pRW13 und pRW14 109

5.4. Proteinchemische Methoden 110
5.4.1. Gewinnung von Lysaten aus *S. cerevisiae* 110
5.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen 111
5.4.3. SDS-PAGE von Proteinen 111
5.4.4. Western-Blot 112
5.4.5. Immunologische Detektion mittels Chemolumineszenz 112
5.4.6. Solubilisierung von Membranproteinen 112
5.4.7. Native Immunpräzipitation solubilisierter Membranproteine 113

5.5. Lipidanalytische Methoden 114
5.5.1. Lipidextraktion nach Hanson und Lester (1980) 114
5.5.2. Lipidextraktion nach Puoti *et al.* (1991) 114
5.5.3. Lipidmodifikation mit PIPLC 114
5.5.4. Milde alkalische Hydrolyse von Lipiden 115
5.5.5. Entsalzung von Lipidextrakten 115
5.5.6. Liposomenpräparation 115
5.5.7. DC von Lipiden 116
5.5.8. Visualisierung von Lipiden 116
5.5.9. Fettsäureanalytik 117

5.6. Supramolekulare Zellchemie 118
5.6.1. Mikrosomenpräparation mit mechanischer Lyse 118
5.6.2. ER-Präparation mit osmotischer Lyse 119
5.6.3. Cytosolpräparation 120
5.6.4. Limitierte Proteolyse von Dgt1p-HA 121
5.6.5. Analyse *in vitro*-generierter COPII-Transportvesikel 121
5.6.6. Bestimmung der *in vitro*-Aktivität der CerS 122
5.6.7. Bestimmung der *in vivo*-Aktivität der IPCerS 122

6. REFERENZEN 124

7. ANHANG 145

7.1. Abkürzungen 145

7.2. Abbildungsverzeichnis 148

1. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Dissertation wurden im wesentlichen folgende Ergebnisse erzielt:

(i) Sequenzhomologe der Membranproteine Lag1p und Dgt1p existieren ubiquitär im eukaryontischen Reich. Allen gemein ist ein hochkonserviertes Motiv, welches sich u.a. durch zwei hydrophile Reste innnerhalb eines Transmembransegments auszeichnet. Ein limitierter proteolytischer Verdau zeigte, daß der N-Terminus von Dgt1p cytosolisch orientiert ist. Im Zusammenhang mit *in silicio*-Analysen ergeben sich für die Familie der *LAG*-Proteine sechs Transmembran-domänen, ein cytosolischer C-Terminus und ein ER-lumenalen Bereich mit ca. 45 Aminosäuren.

(ii) Verschiedene Mutationen von Dgt1p belegen, daß der stark negativ geladene C-Terminus essentiell für die Funktion des Proteins ist. Der lösliche N-Terminus oder dessen Dilysinmotiv, welches den retrograden Transport ER-residenter Proteine vermittelt, besitzen indes keine offensichtliche Bedeutung für Dgt1p.

(iii) Lag1p und Dgt1p erfüllen ihre Funktion in der ER-Membran und sind kein konstitutiver Bestandteil von COPII-Transportvesikeln. Beide Proteine interagieren miteinander und scheinen so einen heteropolymeren Komplex in der ER-Membran auszubilden.

(iv) Die Syntheseraten komplexer Sphingolipide sind in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* drastisch reduziert. In Folge besitzen *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen einen vergleichsweise geringeren Anteil von Sphingolipiden an der Gesamtlipidmenge. Der Lipiddefekt ist nicht in einer fehlerhaften Phosphoinosilierung von Ceramid begründet, da die Aktivität des entsprechenden Enzyms *in vivo* nachgewiesen wurde.

(v) Der Syntheseblock in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen führt zu einer Akkumulation von Sphingoidbasen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß Lag1p und Dgt1p für den Einbau von exogenem Dihydrosphingosin in Ceramid essentiell sind, wohingegen in deren Abwesenheit endogenes Dihydrosphingosin mit einer lediglich reduzierten Rate zu Ceramid konvertiert wird. Die Fettsäureelongation zu C26 ist in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen nicht reduziert. Lipidextrakte von Fumonisin B1-behandelten Wildtypzellen ähneln denen der Doppelmutante, wohingegen letztere von einem toxininduzierten Block der Ceramidsynthase nicht beeinflußt wird. Die Überexpression von *LAG1* und *DGT1* bewirkt keine Überproduktion von Ceramid oder Sphingolipiden. Ein direkter Test der Ceramidsynthase *in vitro* bewies schließlich, daß Lag1p und Dgt1p für diese Reaktion essentiell sind.

(vi) Die Überproduktion der Ceramidasen Ypc1p und Ydc1p in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen erhöht sowohl die Syntheserate als auch die effektiven Mengen komplexer Sphingolipide. Der fehlerhafte Einbau von exogenem DHS in Ceramid wird dadurch nicht revertiert. Die zusätzliche Deletion von *YPC1* und *YDC1* in der Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* reduziert das Niveau inositolhaltiger Sphingolipide unter detektierbare Grenzen und bestätigt so die essentielle Bedeutung von Lag1p und Dgt1p für Ceramidsynthasereaktion.

(vii) Das Überleben von *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen nach einem kurzen Hitzeschock ist im Vergleich zum Wildtyp drastisch eingeschränkt. Darüberhinaus steht die Fähigkeit zur Formierung von Einzelkolonien auf Agarplatten in einem direkten Zusammenhang mit der Temperatur und der Menge an verfügbarem Ceramid.

Aufgrund der erzielten Daten konnten zum ersten Mal die Proteine Lag1p und Dgt1p als essentielle Bestandteile der Ceramidsynthasereaktion charakterisiert werden.

1. SUMMARY

The work presented in this dissertation gave the following results:

(i) Sequence homologous of the membrane proteins Lag1p and Dgt1p exist all over the kingdom of eucaryotes. All of them share a highly conserved motif with two hydrophilic residues within a transmembrane domain. A limited proteolytic digestion showed, that the N-terminus of Dgt1p is orientated to the cytosolic side. Together with the *in silicio* analysis, the proteins of the *LAG* family have six transmembrane domains, a cytosolic C-terminus and an ER lumenal loop of ca. 45 amino acids.

(ii) Different mutants of Dgt1p showed, that the C-terminus is essential for the function of the protein. The soluble N-terminus or its dilysine motif, normally mediating retrieval of ER resident proteins that escaped to the Golgi, have not obvious importance for Dgt1p.

(iii) Lag1p and Dgt1p fulfill their function in the membrane of the ER and are no constitutive parts of COPII transport vesicles. Moreover, both proteins interact with each other and therefore appear to form a heteropolymeric complex in the ER membrane.

(iv) The synthesis rates of complex sphingolipids are drastically reduced in the absence of *LAG1* and *DGT1*. Consequently, *lag1*Δ*dgt1*Δ cells have a decreased portion of sphingolipids compared to the wild type. The lipid defekt is not due to lacking phosphoinositolation of ceramide, since the catalytic activity of the corresponding enzyme was proven *in vivo*.

(v) The synthesis block in *lag1*Δ*dgt1*Δ cells leads to an accumulation of sphingoid bases. In this connection it was shown, that Lag1p and Dgt1p are essential for the incorporation of exogenous dihydrosphingosine into ceramide, whereas in their absence endogenous dihydrosphingosine is converted to ceramide with a merely decreased rate. The elongation of fatty acids to C26 is not reduced in *lag1*Δ*dgt1*Δ cells. Lipid extracts of fumonisin B1 treated wild type cells resemble that of the double mutant, whereas the latter is not influenced by a toxin based inhibition of ceramide synthase. Overexpression of *LAG1* and *DGT1* does not lead to an overproduction of ceramide or sphingolipids. However, a direct *in vitro* assay for ceramide synthase activity finally proved the essential requirement of the reaction for Lag1p and Dgt1p.

(vi) The overproduction of the ceramidases Ypc1p and Ydc1p in *lag1*Δ*dgt1*Δ cells increases the synthesis rates as well as the effective amounts of complex sphingolipids. The defective incorporation of exogenous dihydrosphingosine into ceramide was, however, not reverted. The additional deletion of *YPC1* and *YDC1* in the absence of *LAG1* and *DGT1* decreased the amounts of inositol containing sphingolipids beyond detectable levels and, therefore, confirmed the essential requirement of Lag1p and Dgt1p for the ceramide synthase reaction.

(vii) The survival of *lag1*Δ*dgt1*Δ cells compared to wild type cells after short heat shock is drastically impaired. Moreover, the ability of yeast to form single cells on agar plates directly contributes to the temperature and the amount of ceramide available.

As a consequence of the data obtained, the proteins Lag1p and Dgt1p are the first to be characterized as essential parts of the ceramide synthase reaction.

2. EINLEITUNG

Die Veröffentlichung der kompletten Genomsequenz der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* im Jahr 1996 ebnete Wissenschaftlern den Weg für einen immensen Wissenszuwachs über die Biologie dieses eukaryontischen Einzellers (Mewes *et al*., 1997). Aufgrund der physiologischen Ähnlichkeit zu Zellen höherer Eukaryonten, der einfachen Handhabung sowie eines fundierten methodischen Repertoires dient *S. cerevisiae* häufig als Modellorganismus zur Erforschung biochemischer und zellbiologischer Prozesse. Viele offene Fragen, beispielsweise zur Regulation des Zellzyklus, dem Transport und der Sekretion von Proteinen oder der Organisation des Genoms wurden seither beantwortet. Obwohl es neben der Proteinchemie auch weitreichende Erkenntnisse zur Biosynthese und Funktion von Lipiden oder Sterolen gibt, befindet sich die Forschung auf dem Gebiet der Sphingolipide noch immer in den Anfängen.

Der griechischen Sage nach saß die Sphinx (das altgriechische *sphingo* bedeutet übersetzt *strangulieren*), der Dämon des Todes und der Zerstörung, auf einem hohen Felsen nahe Theben und gab allen Vorbeireisenden ein Rätsel auf. Konnte der Befragte das Rätsel der Sphinx nicht beantworten, so wurde er von dem Dämon zu Tode gewürgt. Als zu Beginn des 20. Jahrhunderts Wissenschaftler zum ersten Mal eine neue Klasse von Membranlipiden mit rätselhafter Zusammensetzung und Funktion entdeckten, nannten sie diese Lipide in Analogie zu der griechischen Sage deshalb *Sphingolipide*. Erst in den letzten Jahren konnte diesen außergewöhnlichen Lipiden neben ihrer Rolle beim Aufbau von Membranen einige essentielle Funktionen zugeordnet werden, die im weiteren Verlauf beschrieben werden.

2.1. Biosynthese von Sphingolipiden

Die Biosynthese von Sphingolipiden beginnt mit der irreversiblen Kondensation von Palmityl-CoA und Serin (Abb. 2.1; Übersicht in Daum *et al.*, 1998; Dickson, 1998; Dickson und Lester, 1999a; Dickson und Lester, 1999b). Neben Kohlendioxid und freiem CoA wird in dieser Reaktion 3-Ketodihydrosphingosin (KDHS) gebildet. Die Serinpalmityltransferase (SPT), ein Multienzymkomplex aus den drei physikalisch assoziierten Proteinen Lcb1p, Lcb2p (Nagiec *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1994) und Tsc3p (Gable *et al.*, 2000) bewerkstelligt diese Reaktion. Lcb2p wird dabei eine mögliche katalytische Aktivität zugeordnet, da es die Bindestelle für die prosthetische Gruppe Pyridoxalphosphat besitzt. Lcb1p ist ebenfalls an der Katalyse beteiligt (Zanolari *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Lcb1p und Lcb2p ist Tsc3p nicht essentiell für die SPT-Aktivität, sondern scheint vielmehr eine Rolle in der Substratbindung zu spielen. Dementsprechend zeigten Funktionsanalysen, daß in Abwesenheit von *TSC3* die Substrathemmung der SPT durch Palmityl-CoA *in vitro* bei weitaus geringerer Konzentration stattfindet und auf diese Weise die Enzymaktivität auch *in vivo* beeinflußt wird (Gable *et al.*, 2000). Die SPT ist das Ziel einiger natürlicher Inhibitoren, zu denen Sphingofungine (Zweerink *et al.*, 1992; Horn *et al.*, 1992), Viridofungine (Mandala *et al.*, 1997a), Lipoxamycin (Mandala *et al.*, 1994) und Myriocin (Miyake *et al.*, 1995) zu zählen sind.

Im weiteren Verlauf der Biosynthese reduziert Tsc10p im nächsten Schritt das Kondensationsprodukt KDHS unter Verbrauch von $NADPH/H^+$ zu der Sphingoidbase Dihydrosphingosin (DHS; auch als Sphinganin bezeichnet; Abb. 2.1). Neben dem endogen synthetisierten kann die Zelle auch extrazelluläres DHS verwerten. Exogenes DHS wird nach der Aufnahme mittels der zwei Kinasen Lcb4p und Lcb5p (Nagiec *et al.*, 1998) am C1-Atom effizient zu DHS-1-Phosphat (DHS-1-P), einer für die weitere Sphingolipidsynthese inaktiven

Vorstufe, phosphoryliert. Diese Modifikation bedingt die Aktion der Sphingoidbase-Phosphatase Lcb3p (Mao *et al.*, 1997; Qie *et al.*, 1997), um DHS-1-P wieder zu dephosphorylieren und somit für den weiteren Syntheseweg bereitzustellen. Wie Lcb3p besitzt auch das homologe Protein Lbp2p DHS-1-P-Phosphataseaktivität (Mandala *et al.*, 1998a), kann aber eine *lcb3*-Mutante hinsichtlich der Inkorporation von exogenem DHS in Ceramid nicht funktionell komplementieren (Qie *et al.*, 1997). Die Aktivität der Kinasen Lcb4p und Lcb5p konnte sowohl im Cytosol als auch membrangebunden nachgewiesen werden, wohingegen Lcb3p nur als Membranprotein vorliegt. Neuesten Erkenntnissen zufolge bilden Kinase und Phosphatase einen physikalisch assoziierten Komplex an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) aus (H. Riezman, persönliche Mitteilung).

Im nächsten Schritt wird eine gesättigte Fettsäure über eine Amidbindung mit DHS verknüpft, um so Dihydroceramid (DHCer) zu bilden (Abb. 2.1). Ein Enzym, welches zu der Klasse der Acyltransferasen zählt und als Sphinganin-*N*-Acyltransferase oder Ceramidsynthase (CerS) bezeichnet wird, katalysiert diese Reaktion auf der cytosolischen Seite des ER (Hirschberg *et al.*, 1993). Obwohl die Regulation der *de novo*-Synthese von Ceramid von sehr großen Interesse ist (siehe später), konnte bisher in keinem Organismus weder ein Gen noch ein Protein identifiziert werden, welches an diesem Schritt beteiligt ist. Wie auch die SPT wird die CerS durch eine Reihe natürlich vorkommender Toxine, z.B. Australifungin (Mandala *et al.*, 1995) oder Fumonisin B1 (FB1; Wang *et al.*, 1991), inhibiert.

Alle bisher aufgeführten, generellen Biosyntheseschritte finden *de novo* im ER statt und sind hochkonserviert in der Hefe über Pflanzen bis zu Säugern (Dickson, 1998). Dennoch unterscheidet sich Säugerceramid strukturell von dem aus *S. cerevisiae* einerseits in der Kettenlänge der Fettsäure, welche in Hefe aus 26 (Lester und Dickson, 1993) und in Säugern aus 18-24 Kohlenstoffatomen besteht. Die Elongation von C20- zu C26-Fettsäuren wird in

Hefe durch ein membranassoziiertes System mit den Komponenten Elo2p und Elo3p bewerkstelligt (Oh *et al.*, 1997). Die Deletion der entsprechenden Gene führt zu einer herabgesetzten Ceramidproduktion und verdeutlicht so die Substratspezifität der Hefe-CerS bzgl. C26-Fettsäuren. Andererseits besitzt Säugerceramid im Sphinganingerüst eine 4,5-*trans*-Doppelbindung (Michel *et al.*, 1997). Anstelle der Einführung dieser Doppelbindung durch die Ceramiddesaturase wird in Hefe der Sphinganinrest am C-4-Atom zum Phytosphingosin (PHS) hydroxyliert und DHCer dadurch zum Phytoceramid (PHCer) modifiziert. Dieser Schritt geschieht unter Katalyse von Sur2p (Haak *et al.*, 1997; Mitchell und Martin, 1997; Grilley *et al.*, 1998), einer membrangebundenen Desaturase/Hydroxylase mit einem Oxozweieisen-(Fe-O-Fe)-Motiv im katalytischen Zentrum. Das gebundene Sauerstoffatom wird dabei von molekularem Sauerstoff bereitgestellt (Shanklin *et al.*, 1997). Obwohl bisher nicht eindeutig gezeigt wurde, ob DHS oder DHCer das bevorzugte Substrat von Sur2p ist, scheinen *in vivo* beide Reaktionswege parallel stattzufinden. Desweiteren ist in Hefe häufig eine Hydroxygruppe am α-Atom des Fettsäurerests anzufinden, wohingegen eine weitere Hydroxylierung entlang der Alkylkette eher selten ist (Lester und Dickson, 1993). Das Gen *SCS7*, welches für ein Protein mit einer Desaturase/Hydroxylase- und einer Cytochrom-B5-ähnlichen Domäne kodiert, ist für diese Reaktion essentiell (Haak *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1998). Aufgrund der verschiedenen Hydroxylierungsgrade läßt sich Ceramid in die vier Klassen I-IV einteilen (Abb. 2.1). Die Analyse von Gesamtlipidextrakten aus *S. cerevisiae* hat gezeigt, daß Ceramid-III am häufigsten vertreten ist, gefolgt von Ceramid-IV (Lester und Dickson, 1993). Das fertige Ceramid wird anschließend vom ER in den Golgi Apparat transportiert, wo es die polaren Kopfgruppen erhält (Puoti *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 2000). Dieser Transport scheint im wesentlichen vesikulär stattzufinden, allerdings können Alternativprozesse nicht ausgeschlossen werden (Kok *et al.*, 1998; Fukasawa *et al.*, 1999).

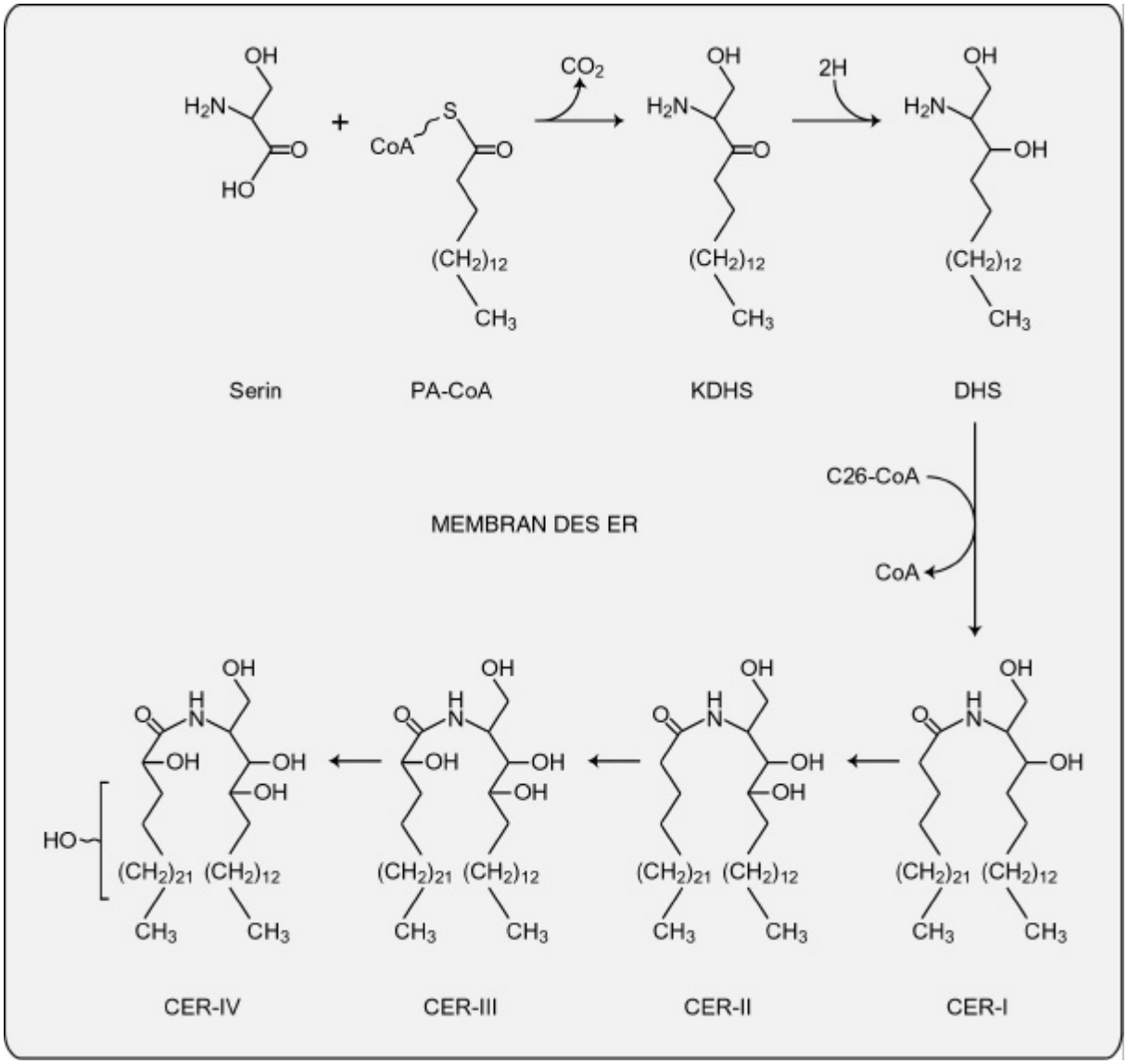


Abb. 2.1: Biosynthese von Ceramid in Hefe. Im ersten Schritt kondensieren Serin und Palmitin-CoA unter Freisetzung von Kohlendioxid zu KDHS. Die folgende Reduktion von KDHS zu DHS erfolgt unter Verbrauch zweier Redoxäquivalenten. Die Sphingoidbase DHS dient als Substrat für die Ceramidsynthese, zu deren Zweck sie mit einer CoA-aktivierten C26:0-Fettsäure *N*-acyliert wird. Das Produkt dieser Reaktion, CER-I, kann durch Hydroxylierung an C4 der Sphingoideinheit (CER-II) und durch zwei weitere Hydroxylierungen entlang der Alkylkette der Fettsäureeinheit zu den häufigsten Ceramiden CER-III und CER-IV konvertiert werden.

In Hefe wird Ceramid durch den Transfer von Phosphoinositol vom Phosphatidylinositol (PI) an die 1-Hydroxygruppe des Ceramid zu Inositolphosphorylceramid (IPC) konvertiert (Becker und Lester, 1980). Diese Reaktion wird von der membrangebundenen PI:Ceramid-Phosphoinositoltransferase (IPCerS) auf der lumenalen

Seite des Golgi katalysiert (Levine *et al.*, 2000). Die verfügbaren Daten deuten darauf hin, daß *AUR1*, ein essentielles Gen, für die IPCerS oder eine Untereinheit des Enzyms kodiert (Nagiec *et al.*, 1997). Die IPCerS-Aktivität wird durch die Toxine Aureobasidin A (Nagiec *et al.*, 1997), Khafrefungin (Mandala *et al.*, 1997b) und Rustmicin (Mandala *et al.*, 1998b) mit einer IC_{50} von weniger als 1 nM inhibiert. Da Säuger kein IPC synthetisieren, ist die IPCerS ein vielversprechendes Ziel zur antifungalen Therapie, insbesondere im Licht des verstärkten Einsatzes von Immunsuppressiva bei Patienten mit Organtransplantaten, im Zuge der Chemotherapie oder bei Patienten mit Defekten im Immunsystem, z.B. im Fall von AIDS.

Im weiteren Verlauf der Sphingolipidbiosynthese wird IPC zu Mannosylinositolphosphorylceramid (MIPC) mannosyliert. Die Deletion von entweder *SUR1* oder *CSG2* verhindert die Bildung von MIPC und führt zu einer Akkumulation von IPC (Beeler *et al.*, 1997). Beide Gene sind nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefe. Sur1p hat eine sequentielle Ähnlichkeit zu der α-Mannosyltransferase Och1p (Nakayama *et al.*, 1992) und wird deshalb als katalytische Einheit in diesem Syntheseschritt angesehen. Csg2p besitzt eine typische EF-Hand zur Kalziumbindung und scheint den Kalziumspeicher im ER zu regulieren (Beeler *et al.*, 1994). Die Notwendigkeit dieses Proteins in der Mannosylierung von IPC ist aber unklar.

Das terminale Produkt der Sphingolipidbiosynthese in *S. cerevisiae* ist Mannosyldiinositolphosphorylceramid ($M(IP)_2C$), welches unter Katalyse von Ipt1p durch das Anhängen eines zweiten Phosphoinositolrests an die Mannoseeinheit von MIPC gebildet wird (Dickson *et al.*, 1997b). Strukturelle Analysen mittels NMR weisen auf eine Verknüpfung nach dem Muster Ceramid-(1)-P-1-Inositol(α-1,2)Mannose(6)-P-1-Inositol hin (Abb. 2.2; Dickson und Lester, 1999a).

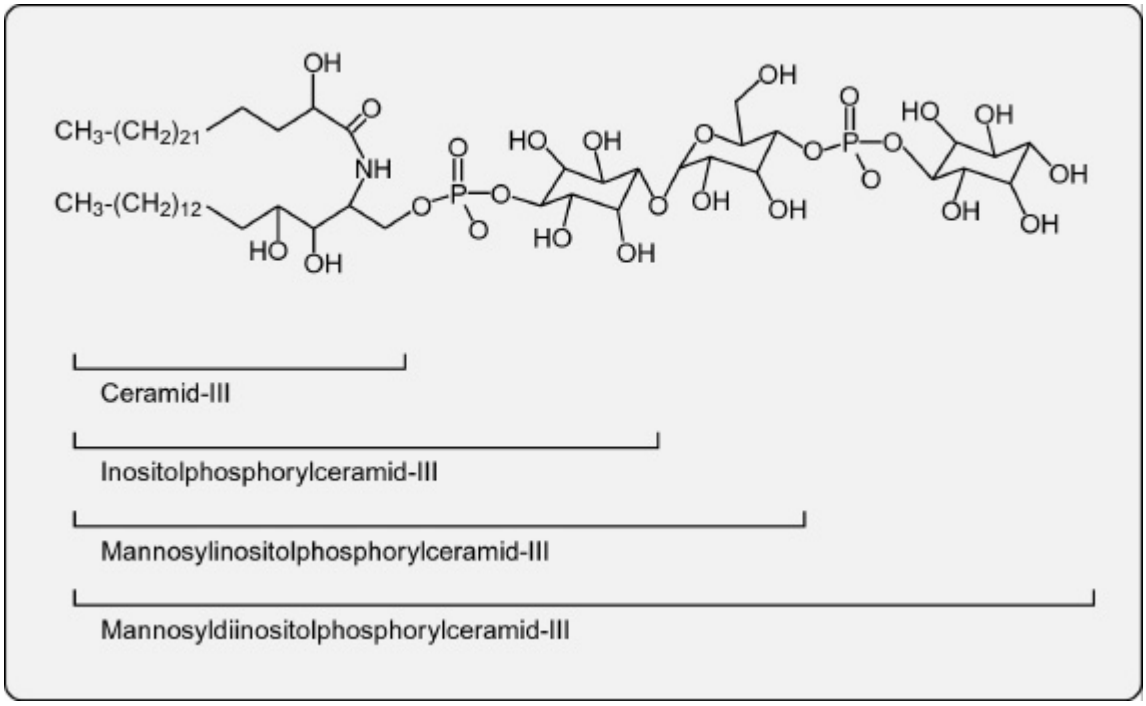


Abb. 2.2: Grundgerüst eines Typ-III $M(IP)_2C$ aus Hefe. Ein *S. cerevisiae* Typ-III Sphingolipid besteht einerseits aus einem lipophilen Ceramidanteil mit PHS und C26:0-OH. Die hydrophile Kopfgruppe setzt sich aus Phosphoinositol, Mannose und einem weiteren Phosphoinositol zusammen. Die Biosynthese des Sphingolipids ist bis zur Ceramidsynthese im ER lokalisiert. Danach wird es zum Golgi transportiert, wo es durch sukzessives Anhängen der hydrophilen Reste fertiggestellt wird.

Der Anteil von $M(IP)_2C$ an der Gesamtmenge von Sphingolipiden in *S. cerevisiae* beträgt normalerweise zwischen 65-75 % (Smith und Lester, 1974), während die restlichen 25-35 % zwischen IPC und MIPC aufgeteilt sind. Obwohl es in diesem Zusammenhang kontrovers erscheint, ist die Synthese von $M(IP)_2C$ nicht ausschlaggebend für den Wildtyp-Phänotyp, und das Fehlen dieses Lipids scheint die Lebensfähigkeit der Hefe nicht zu beeinträchtigen (Dickson *et al.*, 1997b; Leber *et al.*, 1997). Ein Defekt in der Synthese von $M(IP)_2C$ bewirkt indes eine erhöhte Resistenz der Zelle gegenüber dem Fungizid Nystatin. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Nystatin und Sterolen und im Zusammenhang mit dem Wissen um die Interaktion von Sphingolipiden und Cholesterol/Ergosterol in der Plasmamembran (siehe später) ist es deshalb denkbar, daß $M(IP)_2C$ die Membraninsertion und Oligomerisierung von speziell Nystatin vermittelt.

2.2. Abbau von Sphingolipiden

Im Gegensatz zu Hefe besitzen Säugerzellen keine inositolhaltigen Sphingolipide. Stattdessen synthetisieren sie zum einen eine große Bandbreite an Glycosphingolipiden – Ceramide mit unterschiedlichen Zuckerresten – oder Sphingomyelin, ein Ceramid mit Phosphocholin als polarer Kopfgruppe. Der Abbau von speziell Sphingomyelin mittels verschiedener Sphingomyelinasen (Quintern *et al.*, 1989; Chatterjee *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2000) ist exakt kontrolliert und bewirkt eine Reihe zellbiologischer Prozesse. Der Abbaumechanismus und dessen Beudeutung wird in Kapitel 2.3.3 näher besprochen. Die Hauptsphingolipide IPC, MIPC und $M(IP)_2C$ der Hefe sind vergleichsweise stabil (Lester und Dickson, 1993), obwohl es Indizien für eine Sphingolipid-Phospholipase-C-Aktivität gibt (Wells *et al.*, 1998). Als Komplement zu der CerS wurde in *S. cerevisiae* kürzlich ein Gen identifiziert, welches für die Phytoceramidase Ypc1p kodiert (Mao *et al.*, 2000a). Die Autoren fanden, daß Ypc1p spezifisch PHCer spaltet und dabei PHS freisetzt. Interessanterweise vermittelt die Überexpression von *YPC1* Wildtypzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem CerS-Inhibitor FB1, ein Phänomen, welches auf die reverse und FB1-resistente Aktivität der Ceramidase zurückzuführen ist. Die biologische Signifikanz dieser ceramid-synthetisierenden Reaktion ist nicht bekannt. In der Hefedatenbank ist ebenfalls das Gen *YDC1* (YPL087c) eingetragen, welches für eine Ceramidase mit einer Spezifität für DHCer kodiert (Mao *et al.*, 2000b). Wie Ypc1p ist auch Ydc1p zur Umkehrreaktion befähigt, wenngleich in einem geringeren Maße. *DPL1* kodiert für eine Lyase zur Spaltung von DHS-1-P zu Phosphoethanolamin (Etn-P) und Palmitinaldehyd (Saba *et al.*, 1997). Letzere Verbindung kann nach Oxidation zu Palmitat in den generellen Lipidstoffwechsel eingehen, während Etn-P als Baustein für die Synthese von Aminoglycerophospholipiden dient (Percy *et al.*, 1984).

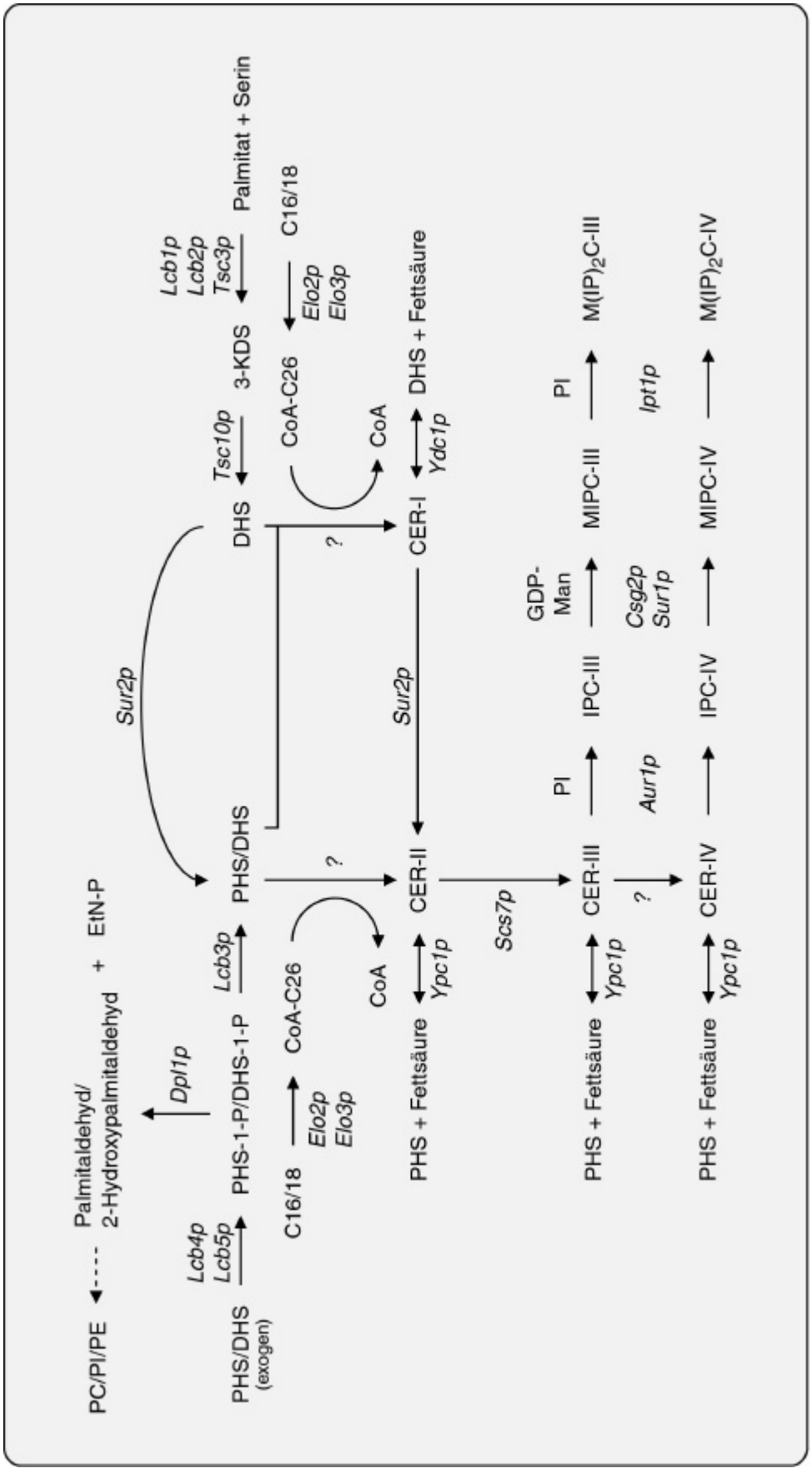


Abb. 2.3: Zusammenfassende Darstellung aller bekannten metabolischen Reaktionswege von Sphingolipiden in *S. cerevisae*.
Ausführliche Beschreibungen der einzelnen Schritte sind in den Kapiteln 2.1 und 2.3 aufgeführt.

2.3. Funktion von Sphingolipiden

2.3.1. Sphingolipide im Membranaufbau

IPC, MIPC und $M(IP)_2C$ befinden sich hauptsächlich in der Plasmamembran mit einem Anteil von 30 % an der dortigen Gesamtmenge von Phospholipiden (Patton und Lester, 1991; Hechtberger *et al.*, 1994). Kleinere Mengen von IPC kommen auch im Golgi oder in der Vakuole vor, wohingegen Mitochondrien nur geringste Spuren an Sphingolipiden aufweisen. Es ist indes nicht klar, ob diese Lipide in Hefe enstprechend dem Säugermodell bevorzugt in der extrazellulären Seite der Doppelmembran vorkommen (van Echten und Sandhoff, 1993). Aufgrund der stärkeren Hydrophobizität von Ceramid im Vergleich zu DAG besitzen Sphingolipide einen höheren Schmelzpunkt als Glykolipide. Es wurde deshalb vorgeschlagen, daß Sphingolipide unter nativen Bedingungen in einer flüssig-geordneten Phase vorkommen und sich so von den flüssig-ungeordneten Glykolipiden in der Membran lateral abgrenzen. Diese Idee der lateralen Heterogenität wurde in Modellmembranen mit Hilfe von Fluoreszenzspektrometrie bestätigt (Ahmed *et al.*, 1997). Als Folge dieser Abgrenzung werden in der Membran sogenannte Mikrodomänen postuliert. Die physikalische Erklärung für die Ausbildung dieser Domänen scheint in einer van-der-Waals-Wechselwirkung entlang der gesättigten Acylketten zu liegen (Schroeder *et al.*, 1994). Cholesterol/Ergosterol ist ebenfalls in sphingolipid-angereicherten Mikrodomänen vorhanden und scheint dabei zum einen durch Interaktion mit Sphingolipiden eine dichtere Packung zu erlauben (Smaby *et al.*, 1996), und zum anderen vermehrt im Grenzbereich zwischen Sphingo- und Glykolipiden vorzukommen, um so einen energiebegünstigten Übergang zwischen den beiden Lipidphasen zu vermitteln (Cruzeiro-Hansson *et al.*, 1989).

Ein weiteres, wesentliches Merkmal von Ceramid ist die bereits erwähnte ungewöhnliche Kettenlänge der Fettsäure, C26 in Hefe und C18-24 in Säugerzellen. Im Vergleich zu DAG mit einer Kettenlänge von 16-18 ergibt sich dadurch eine Vergrößerung des Membranquerschnitts in Bereichen mit hohem Anteil an Sphingolipiden. Dieser Heterogenität der Membran wird eine signifikante biologische Bedeutung zugeschrieben, die sich in der Polarität von Epithelzellen oder auch der Proteinsortierung äußert (Zegers und Hoekstra, 1998; Levine *et al.*, 2000). Transmembrandomänen (TMD) integraler Membranproteine in Hefe besitzen eine Länge von 15-22 Aminosäuren. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß diese Länge im Fall von ER- oder golgiresidenten Membranproteinen ca. 15 Aminosäuren beträgt, während die der Plasmamembranproteine durchschnittlich 20-23 ist. Im Licht der prozentualen Sphingolipidverteilung zugunsten der Plasmamembran und der auf den Golgi Apparat beschränkten Sphingolipidsynthese liegt deshalb die Vermutung nahe, daß Membranproteine mit kürzeren TMD vom vesikulären Transport zur Plasmamembran durch dickere Membranschichten der Vesikel ausgeschlossen sind und so eine effiziente Proteinsortierung stattfindet (Levine *et al.*, 2000).

2.3.2. Transport GPI-verankerter Proteine

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine stellen eine eigene Klasse membranassoziierter Proteine dar, befinden sich hauptsächlich in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen und sind z.B. an enzymatischen Prozessen, am Zellwandaufbau oder Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Übersicht in McConville und Ferguson, 1993; Popolo und Vai, 1999). Zur Synthese des GPI-Ankers in Hefe werden einem PI schrittweise *N*-Acetylglucosamin und drei Mannosereste angehängt. Die Mannosemoleküle sind jeweils mit

Etn-P verknüpft (Flury *et al.*, 2000), wobei die Aminogruppe des terminalen Etn-P zur Verbindung mit dem C-Terminus des Proteins dient (Abb. 2.3). Die Struktur des Ankers kann aber in verschiedenen Zelltypen variieren. Während die Ankersynthese an der cytosolischen Seite der ER-Membran stattfindet (Vidugiriene und Menon, 1993; Vidugiriene und Menon, 1994), geschieht die Verankerung mit dem Vorläuferprotein in der Transamidasereaktion lumenal (Vidugiriene und Menon, 1995). Es ist indes nicht klar, wie und zu welchem Zeitpunkt der Anker über die Membran des ER transloziert. Verfügbare Indizien deuten darauf hin, daß der Anker vor der Translokation komplett fertiggestellt wird.

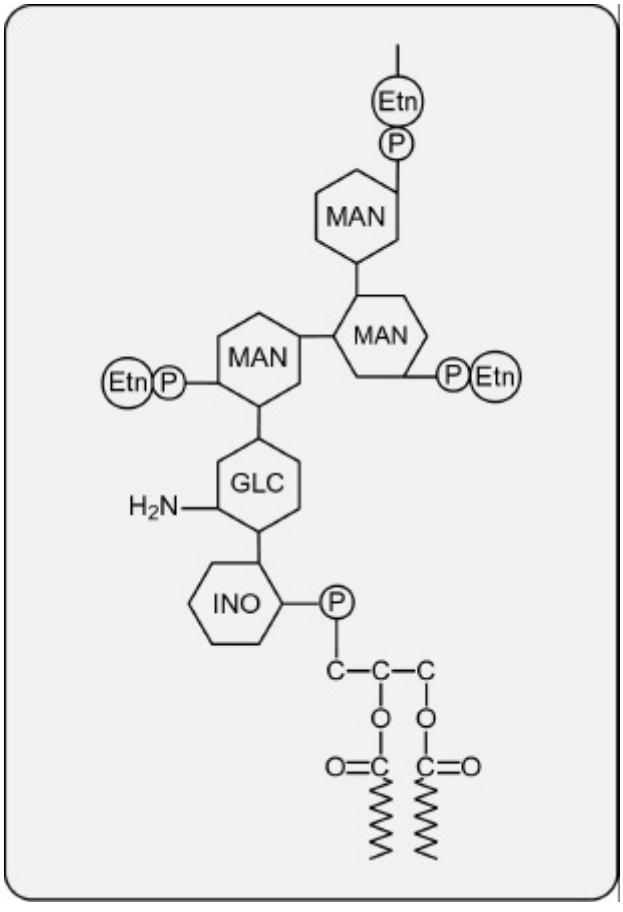


Abb. 2.4: Grundstruktur des GPI-Ankers in Hefe. Den meisten eukaryontischen GPI-Ankern ist die Struktur EtN-P-6Mannoseα1-2Mannoseα1-6Mannoseα1-4GlcNα1-6PI gemein. Das terminale Etn-P dient zur Verankerung mit dem Protein. In Hefe können die Mannosereste mit zusätzlichen Etn-P verbunden sein. Die Lipideinheit besteht in Säugern gewöhnlich aus *sn*-1-Alkyl-*sn*-2-Acylglycerol, in Hefe aus *sn*-1,2-Diacylglycerol (hier dargestellt) oder Ceramid.

In der Transamidasereaktion wird von dem Vorläuferprotein eine spezifische C-terminale Signalsequenz, welche vermutlich auch zur vorübergehenden Membranverankerung dient, abgetrennt und stattdessen der GPI-Anker angehängt. Mindestens zwei Proteine, Gaa1p und Gpi8p, sind für diesen Schritt in Hefe (Hamburger *et al.*, 1995; Benghezal *et al.*, 1996; Ohishi *et al.*, 2000) als auch Säugern (Hiroi *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1999) notwendig. Nach abgeschlossener Biosynthese wird der Diacylglycerol (DAG)-Anteil vieler GPI-verankerter Proteine im ER oder Golgi gegen ein Ceramid ausgetauscht bzw. mit einer C26-Fettsäure an der *sn*-2 Position versehen (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1997). Das fertige GPI-verankerte Proteine wird schließlich vesikulär zu seinem Zielort, der Plasmamembran, transportiert.

Eine Interaktion GPI-verankerter Proteine mit Sphingolipiden wurde das erste Mal in MDCK-Zellen aufgrund einer Resistenz der GPI/Sphingolipid/Cholesterol-reichen Mikrodomänen gegenüber kalter Detergenzextraktion gezeigt (Brown und Rose, 1992). Die Tatsache, daß die Bildung dieser Domänen während des sekretorischen Wegs erst ab dem Golgi identifiziert wurde, begründeten die Autoren damit, daß dies der Syntheseort der komplexen Sphingolipide sei. Mittlerweile wurde die Präsenz solcher Mikrodomänen in der Plasmamembran von Säugerzellen auch unter nativen Bedingungen nachgewiesen (Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Varma und Mayor, 1998). Eine Inhibition der CerS mittels FB1 führt zu einer fehlerhaften Sortierung und einem ineffizienten Transports GPI-verankerter Proteine zur Plasmamembran (Mays *et al.*, 1995; Ledesma *et al.*, 1998). Einen ähnlichen Effekt der GPI-Fehlsortierung ergibt eine Verringerung der Cholesterolverfügbarkeit für MDCK-Zellen (Hannan und Edidin, 1996). In Hefe gibt es hingegen nur wenig Informationen über eine physikalische Assoziation von GPI-verankerten Proteinen und Sphingolipiden. Ein Block der SPT mittels Myriocin oder der

temperatursensitiven Mutante *lcb1-100* führt zu einem rapiden Stop des Ausschleusens GPI-verankerter Proteine aus dem ER (Horvath *et al.*, 1994; Sütterlin *et al.*, 1997). Die Tatsache, daß die Überexpression eines Gens für ein GPI-verankertes Protein den Phänotyp einer sphingolipid-defizienten Mutante partiell supprimiert, beleuchtet ebenfalls die Bedeutung der Sphingolipidbiosynthese im Transport GPI-verankerter Proteine (Skryzypek *et al.*, 1997). Die genaue molekulare Funktion von Sphingolipiden ist in dieser Hinsicht aber noch ungeklärt. Ebenso unklar ist, ob Ceramid oder DHS/PHS für den Transport zum Golgi ausschlaggebend ist. Interessanterweise bedingt ein Defekt in der frühen GPI-Ankersynthese eine Reduktion der IPC- und MIPC-Synthese (Schönbächler *et al.*, 1995), vermutlich aufgrund einer Herabsetzung der SPT-Aktivität. Die Verbindung dieser beiden Prozesse konnte zwar bisher nicht molekular identifiziert werden, unterstreicht aber die koordinierte Biosynthese von Sphingolipiden und GPI-verankerten Proteinen.

2.3.3. Die Rolle von Ceramid in der Signaltransduktion

Die Erfassung von Reizen oder veränderten Umweltzuständen ist für das Überleben einzelner Zellen oder eines Zellverbunds von essentieller Bedeutung. Nur durch eine spezifische Reaktion kann sich der Organismus den äußeren Einflüssen anpassen und auf diese Art und Weise das eigene Fortbestehen sichern. Um eine derartige Reaktion hervorzurufen, muß die Art und Qualität des Reizes über definierte Signaltransduktionswege von der Rezeption weitergeleitet werden. In jüngster Zeit konnte bestimmten Sphingolipiden eine Funktion in der Signaltransduktion sowohl in Säugern (Übersicht in Mathias *et al.*, 1998) als auch in Hefe (Übersicht in Dickson, 1998; Dickson und Lester, 1999a) zugeordnet werden.

In Säugerzellen interagiert Ceramid als Sekundärbotenstoff direkt mit einer ceramidaktivierten Proteinphosphatase (CAPP; Dobrowsky *et al.*, 1993) sowie -kinase (CAPK; Mathias *et al.*, 1991) oder der Proteinkinase C (PKCζ; Muller *et al.*, 1995). Ceramid kann zusätzlich auch mit verschiedenen Signalsystemen interagieren, z.B. dem mitogenaktivierten Kinaseweg (Yao *et al.*, 1995), dem Junkinaseweg (Verheij *et al.*, 1996), den Caspase-Proteasen (Susin *et al.*, 1997) oder auch dem mitochondrialen Signalweg (Martin *et al.*, 1995; Gudz *et al.*, 1997). Auf diese Art und Weise vermittelt es Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest oder Apoptose, signalisiert aber auch Entzündungen und wirkt so auf das Immun- und Zentralnervensystem und das Endokrine und Vaskuläre System ein (Übersicht in Mathias *et al.*, 1998). Seine große klinische Bedeutung gewann Ceramid als Botenstoff in Verbindung mit einer Reihe schwerer Krankheiten wie Atherogenese (Marathe *et al.*, 1998), Diabetes (Begum *et al.*, 1996; Kanety *et al.*, 1996; Peraldi *et al.*, 1996), Gebärmutterkrebs (Rylova *et al.*, 1997) und Reperfusionsverletzung (Bielawska *et al.*, 1997). Die Entstehung des Sekundärbotenstoffs Ceramid sowie deren biologische Auswirkung in Säugerzellen ist zum einen abhängig vom Zelltyp und zum anderen bedingt durch die Art und Qualität des Reizes. Tumornekrosefaktor α (TNFα), Interleukin-1β (IL-1β), Nervenwachstumsfaktor oder Fasligand stimulieren Sphingomyelinasen (Quintern *et al.*, 1989; Chatterjee *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2000), was zur Spaltung von Sphingomyelin in der Plasmamembran und folglich zur Freisetzung von Ceramid führt. Im Gegensatz dazu bewirken Anthracycline (Bose *et al.*, 1995), Lipopolysaccharide (Balsinde *et al.*, 1997) oder Camptothecin (Suzuki *et al.*, 1997) eine Zunahme der *de novo*-Synthese von Ceramid via der CerS (Abb. 2.5).

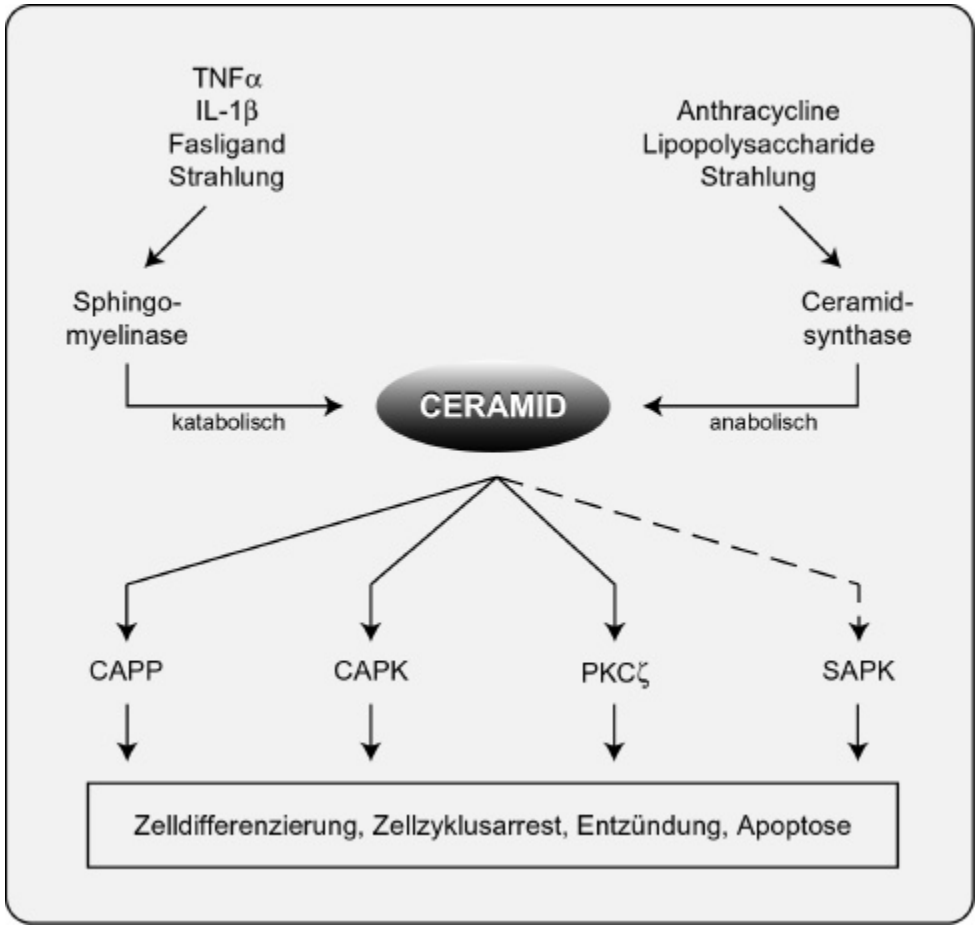


Abb. 2.5: Entstehung und Wirkung von Ceramid als Stresssignal in Säugerzellen. Ceramid kann entsprechend der Art und Qualität des Reizes entweder über die Spaltung von Sphingomyelin oder die *de novo*-Synthese formiert werden. Diese Schritte involvieren die Enzyme Sphingomyelinase oder Ceramidsynthase. In Folge interagiert Ceramid direkt mit CAPP, CAPK und PKCζ, oder oder indirekt mit diversen SAPK. Auf diese Art und Weise signalisiert Ceramid Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest, Entzündung oder Apoptose.

In Hefe hat die Inhibition der IPCerS den Zelltod zur Folge. Nagiec *et al.* (1997) mutmaßten, daß die begleitende Akkumulation von Ceramid hierfür ausschlaggebend sein könnte. Die Tatsache, daß in *S. cerevisiae* eine CAPP identifiziert wurde (Fishbein *et al.*, 1993), welche einen G1-Zellzyklusarrest bewirkt (Nickels und Broach, 1996), unterstützt das Postulat eines phylogenetisch alten und konservierten Ceramidsignalwegs in Eukaryonten. Aufgrund der hohen Stabilität inositolhaltiger Sphingolipide wird allerdings vermutet, daß im Gegensatz zu Säugerzellen in Hefe der Botenstoff Ceramid hauptsächlich *de novo* gebildet

wird. Die Überlebensfähigkeit von Hefezellen im Hitzestreß beispielsweise ist koordiniert mit einem zeitversetzten Anstieg von DHS/PHS, DHS-1-P/PHS-1-P und schließlich Ceramid, wobei nur letzteres einen erhöhten Level beibehält und die Sphingoidbasen oder -phosphate nach 10 min bzw. 20 min wieder abnehmen (Jenkins *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998). Es gibt bisher keine eindeutigen Daten zur Regulation dieser Stressantwort, Vermutungen schließen aber eine temperaturabhängige Aktivierung der CerS nicht aus. Obwohl dem Ceramid eine Rolle im Hitzestreß nicht abzusprechen ist, scheinen dennoch die phosphorylierten Sphingoidbasen durch transkriptionelle Aktivierung trehalosesynthetisierender Enzyme für das Überleben verantwortlich zu sein (Mandala *et al.*, 1998a; Skrzypek *et al.*, 1999).

In Säugerzellen übernimmt Sphingosinphosphat wichtige Funktionen, z.B. indem es der apoptotischen Wirkung von Ceramid entgegensteht und zellproliferierend wirkt oder Mitogenese einleitet (Cuvillier *et al.*, 1996). Vor kurzem wurde gezeigt, daß es die Aktivierung der Caspasen inhibiert und somit den ceramidvermittelten Signalweg unterbricht (Cuvillier *et al.*, 1998). Neben den Sphingosinkinasen und -phosphatasen ist die CerS in diesem Zusammenhang ein kritisches Enzym, da es den relativen Level von Sphingoidbase und Ceramid balanciert und somit das Schicksal der Zelle bestimmt. Die Regulation der CerS ist von großem Interesse, insbesondere, da eine Reihe chemotherapeutischer Agenzien über die *de novo*-Ceramidsynthese eine apoptotische Wirkung aufweisen (Bose *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1997). Es konnte dennoch bisher in keinem Organismus weder ein Gen noch ein Protein identifiziert werden, welches für diesen *N*-Acyltransfer verantwortlich ist.

2.3.4. Weitere Funktionen von Sphingolipiden

Der erste Hinweis in *S. cerevisiae* auf eine Rolle der Sphingolipide in genereller Stressresistenz kam von Analysen sphingolipiddefizienter Stämme. Obwohl die Sphingolipidbiosynthese, angefangen bei der SPT, für Hefe essentiell ist (Wells und Lester, 1983; Pinto *et al.*, 1986), konnte eine Mutante, genannt SLC, ohne detektierbare Mengen an Sphingolipiden wachsen (Dickson *et al.*, 1990). Dieser Stamm trägt neben der Deletion von *LCB1* oder *LCB2* (Nagiec *et al.*, 1994) eine Punktmutation im Gen *SLC1* (Nagiec *et al.*, 1993) und erlaubt so einer mutmaßlichen Fettsäureacyltransferase die Synthese von DAG-basierten Phospholipiden mit C-26 Fettsäuren an der *sn*-2 Position und Kopfgruppen ensprechend der Sphingolipidklassen (Lester *et al.*, 1993). Die neuen SLC-Lipide ahmen somit die Struktur höherer Sphingolipide nach und können vermutlich auch einige Funktionen kompensieren. Dennoch sind SLC-Zellen im Gegensatz zum Wildtyp nicht befähigt, bei pH 4, 37 °C oder in der Gegenwart von 750 mM Natriumchlorid zu wachsen. Extrazelluläre Sphingoidbasen zur Kompensation des endogenen Synthesedefekts hingegen stellen sowohl die Sphingolipidsynthese als auch die Wachstumsfähigkeit der Zellen unter den genannten Bedingungen wieder her, sodaß deren intrazelluläre Präsenz als Mediator der Stressbewältigung für essentiell erachtet wird. Der Mechanismus für diese Resistenz beispielsweise gegenüber niedrigem pH ist zwar nicht geklärt, Modelle ziehen aber eine sphingolipidvermittelte Regulation der Plasmamembran-ATPase Pma1p (McCusker *et al.*, 1987) zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Optimums in Betracht (Dickson, 1998).

Eine Suche, welche auf die Identifikation von Genen zur intrazellulären Kalziumregulation ausgerichtet war, führte zur Isolierung der kalziumsensitiven Mutanten *csg1* und *csg2* (Beeler *et al.*, 1994). Beide Mutanten besitzen einen Defekt in der

Mannosylierung von IPC (Zhao *et al.*, 1994; Beeler *et al.*, 1997) und wachsen normal in Standardmedien. Suppressormutanten, welche die Sensitiviät von *csg2* gegenüber 100 mM Kalzium revertieren, reduzieren entweder die Synthese von IPC-III (Beeler *et al.*, 1998) oder verändern den Hydroxylierungsgrad dieses Lipids (Haak *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1998). Es wird deshalb vermutet, daß speziell IPC-III im Zusammenhang mit der Kalziumhomöostase in *S. cerevisiae* steht oder generell die Sphingolipidbiosynthese möglicherweise über Kalzium reguliert wird (Dickson, 1998; Schneiter, 1999). In Säugerzellen bewirkt Sphingosin und Sphingosinphosphat eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Organellen (Spiegel und Merrill, 1996), möglicherweise aufgrund eines Kalziumkanals in der ER-Membran, welcher über Sphingosylphosphocholin reguliert wird (Mao *et al.*, 1996).

Neueste Erkenntnisse auf dem Bereich der fungalen Lipidforschung beleuchten zwei weitere, bedeutende Funktionen von Sphingoidbasen. Zum einen konnte gezeigt werden, daß DHS/PHS für den Internalisierungsschritt im endozytischen Prozess und die Organisation des Zytoskeletts essentiell ist (Zanolari *et al.*, 2000). Ein entsprechender Defekt wird durch die Deletion der Proteinphosphatase 2A sowie der vermehrten Synthese zweier Proteinkinasen im Sinne der korrekten Aktinorganisation revertiert (Friant *et al.*, 2000). Es erscheint somit naheliegend, daß Sphingoidbasen eine Funktion in der Proteinphosphorylierung innehaben. In diesem Zusammenhang steht auch der DHS/PHS-abhängige Proteinabbau via der vakuolären Degradation und des 26 S-Proteasoms (Chung *et al.*, 2000). Dieser Abbau benötigt die Formation von Multiubiquitinketten, eine Tatsache, die durch die Fähigkeit des Ubiquitinvorläuferproteins Ubi4p (Finley *et al.*, 1987) als Suppressor der *lcb1-100*-Mutante bestätigt wird (H. Riezman, persönliche Mitteilung).

2.4. Vorarbeiten und Zielsetzung

Lag1p und Dgt1p sind zwei integrale ER-Membranproteine aus *S. cerevisiae*, die zueinander eine 70 %-ige Sequenzidentität besitzen (Barz und Walter, 1999). Die zellbiologische Funktion der Proteine ist nicht bekannt. Die Deletion eines der kodierenden Gene hat keinen offensichtlichen Phänotyp, wohingegen die Doppeldeletion die Lebensfähigkeit der Zellen gravierend beeinträchtigt. Im Gegensatz zum Wildtyp besitzten *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletionszellen eine um ca. 50 % verringerte Wachstumsrate, eine sehr stark herabgesetzte Transformationseffizienz und eine verdickte Zellwand. Letzteres scheint in einer fehlerhaften Ablagerung von Zellwandmaterial im Zuge des Alterns zu sein, da junge Knospen der Doppelmutante im Elektronenmikroskop denen vom Wildtyp gleichen (Abb. 2.6).

Der entscheidende Effekt der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletion ist aber ein um 50 % verlangsamter Transport GPI-verankerter Proteine vom ER zum Golgi. Anderen Klassen sekretorischer Proteine sind von dieser Retardation nicht betroffen. Auf der Suche nach Überexpressionssuppressoren des *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekts konnten die zwei unbekannten offenen Leserahmen YBR183w und YPL087w isoliert werden. Die Deletion eines oder beider Gene bewirkt keinen nennenswerten Phänotyp. Der Vierfachdeletionsstamm *lag1*Δ*dgt1*Δ*ybr183w*Δ*ypl087w*Δ ist nicht letal, besitzt aber im Vergleich zum *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletionsstamm eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung von Einzelkolonien.

Im Zuge der vorliegenden Dissertation sollten Lag1p und Dgt1p näher charakterisiert und deren Rolle, sowie nach Möglichkeit der der Suppressorproteine, im Transport GPI-verankerter Proteine identifiziert werden.

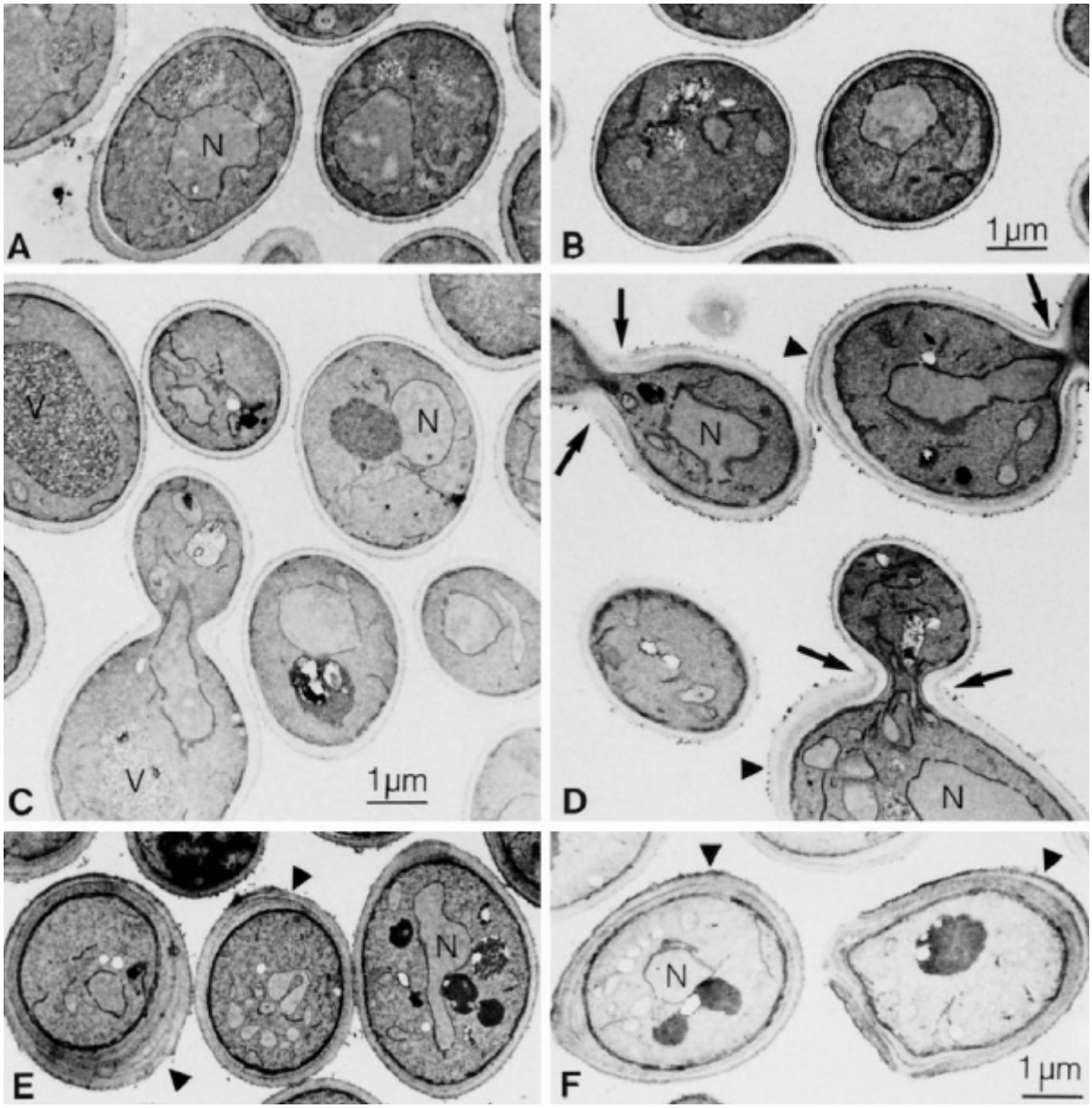


Abb. 2.6: EM Aufnahme von Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen (Barz und Walter, 1999). Ein Vergleich von Wildtyp- (A), *lag1*Δ- (B), *dgt1*Δ- (C) und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen (D-F) verdeutlicht den spezifischen Zellwanddefekt der Mutterzellen der Doppelmutante. N, Nukleus; V, Vakuole.

3. ERGEBNISSE

3.1. Allgemeine Charakterisierung von Lag1p und Dgt1p

3.1.1. Lag1p und Dgt1p sind konserviert in höheren Eukaryonten

S. cerevisiae ist aufgrund seiner einfachen genetischen Zugänglichkeit ein Modellorganismus zur Aufklärung komplexer biologischer und biochemischer Prozesse. Die Identifikation homologer Proteine erlaubt das Postulat von im wesentlichen ähnlichen Prozessen auch in höheren Eukaryonten wie Säugern oder Pflanzen. *LAG1* und *DGT1* aus *S. cerevisiae* kodieren für Membranproteine mit einer Sequenzidentität von ca. 70 %. Erste Datenbankabfragen präsentierten jeweils ein Sequenzhomolog in *S. pombe* (*LAG1*) und *H. sapiens* (*UOG1*), sowie derer zwei in *C. elegans* (*LAG1*, *LAG2*) (Jiang *et al.*, 1998; Barz und Walter, 1999). Im Zuge der fortgeschrittenen Genomanalyse in diversen Organismen sollte dieses Bild weiter vervollständigt werden, um später artübergreifende Aussagen über die Funktion von Lag1p und Dgt1p machen zu können.

Mit den bisher beschrieben Homologen als Basis wurden insgesamt neun weitere Sequenzen in den Datenbanken identifiziert, die eine signifikante Ähnlichkeit zu *LAG1* und *DGT1* aufweisen (Abb. 3.1). Vier von diesen führen auf komplette offene Leserahmen zurück, die übrigen fünf sind mutmaßliche Translate expremierter Sequenzabschnitte. Ein Sequenzvergleich der komplett kodierten Proteine zeigte, daß der N-terminale Bereich relativ heterogen ist, jedoch ein mittlerer und der C-terminale Bereich eine konservierte Primärsequenz aufweisen (Abb. 3.2).

Nummer	GEN	Organismus	Trivialname
U08133	*LAG1*	*Saccharomyces cerevisiae* (Sc)	Bäckerhefe
YKL008c	*DGT1*	*Saccharomyces cerevisiae* (Sc)	Bäckerhefe
AF198177	*ASC1*	*Lycopersicon esculentum* (Le)	Tomate
AF198179	*LAG1*	*Arabidopsis thaliana* (At)	Ackerschmalwand
AF198180	*LAG2*	*Arabidopsis thaliana* (At)	Ackerschmalwand
U76608	*LAG1*	*Schizosaccharomyces pombe* (SP)	Spalthefe
O59735	*LAG2*	*Schizosaccharomyces pombe* (SP)	Spalthefe
U42438	*LAG1*	*Caenorhabditis elegans* (Ce)	Spulwurm
U40415	*LAG2*	*Caenorhabditis elegans* (Ce)	Spulwurm
M62301	*UOG1*	*Mus musculus* (Mm)	Maus
M62302	*UOG2*	*Homo sapiens* (Hs)	Mensch
AI965754	EST	*Glycine max* (Gm)	Soja
AI166337	EST	*Populus balsamifera* (Pb)	Balsampappel
AU002679	EST	*Bombyx mori* (Bm)	Seiden- oder Maulbeerspinner
C82217	EST	*Paralichthys olivaceus* (Po)	Japanische Flunder
AI069387	EST	*Magnaporthe grisae* (Mg)	Reisbrandpilz

Abb. 3.1: Liste der Homologen zu *LAG1* aus *S. cerevisiae.* Die Homologen zu Lag1p und Dgt1p wurden mittels der gängigen Suchprogramme in den Datenbanken identifiziert. In der ersten Spalte sind die Datenbankzugangsnummern der Gene aus Spalte 2 aufgelistet. Die Gennamen sind für diese Arbeit zum Teil neu vergeben worden.

Darüberhinaus ist der C-Terminus bei allen postulierten Proteinen durch Aspartat- und Glutamatreste stark sauer und unter nativen Bedingungen vermutlich negativ geladen. Der mittlere Sequenzbereich wurde aufgrund der starken Homologie bereits früher als *LAG*-Motiv bezeichnet (Jiang *et al.*, 1998), allerdings gab es keinerlei Aussagen hinsichtlich einer möglichen Funktion weder dieses Motives noch der kompletten Proteine.

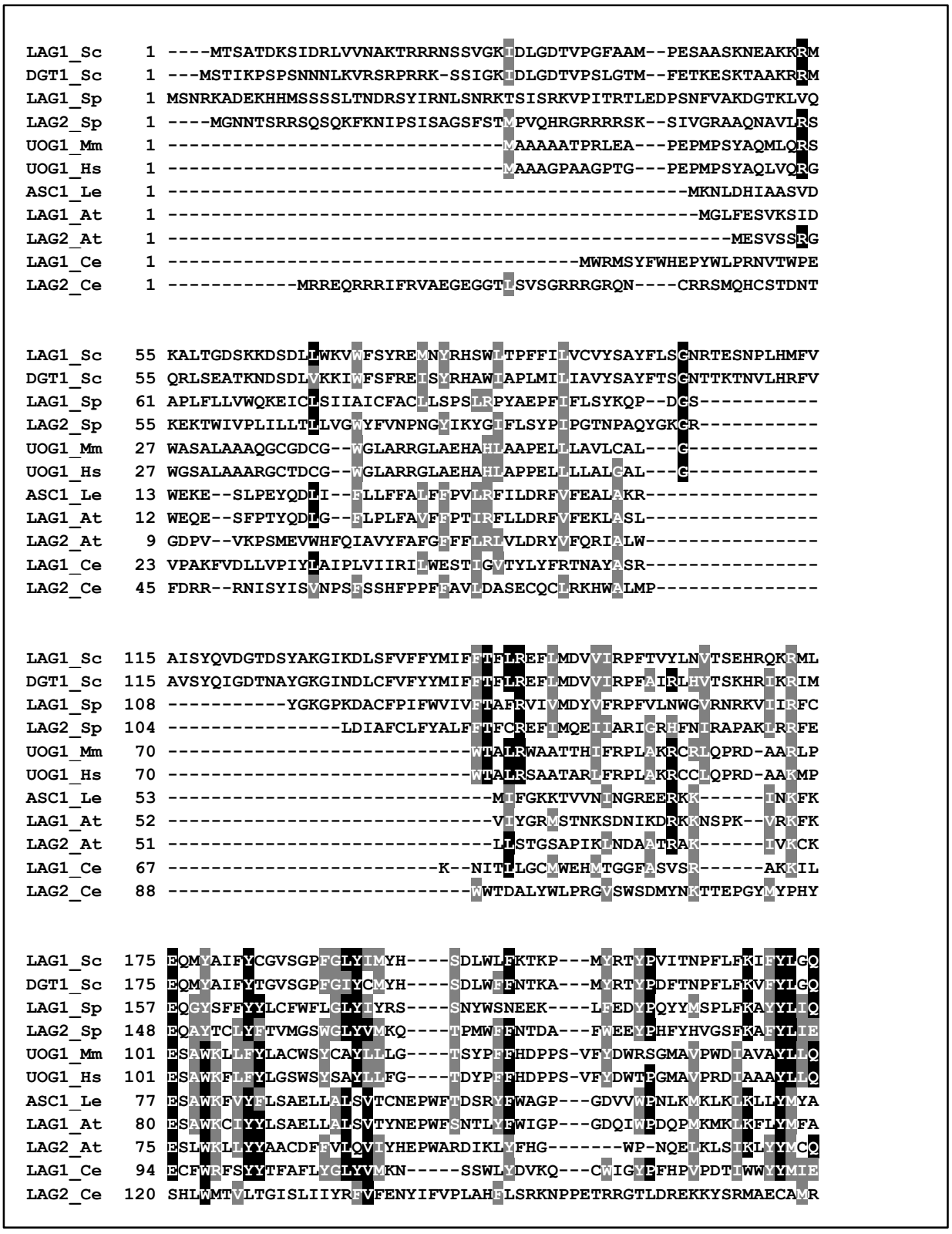


Abb. 3.2: Fortsetzung nächste Seite

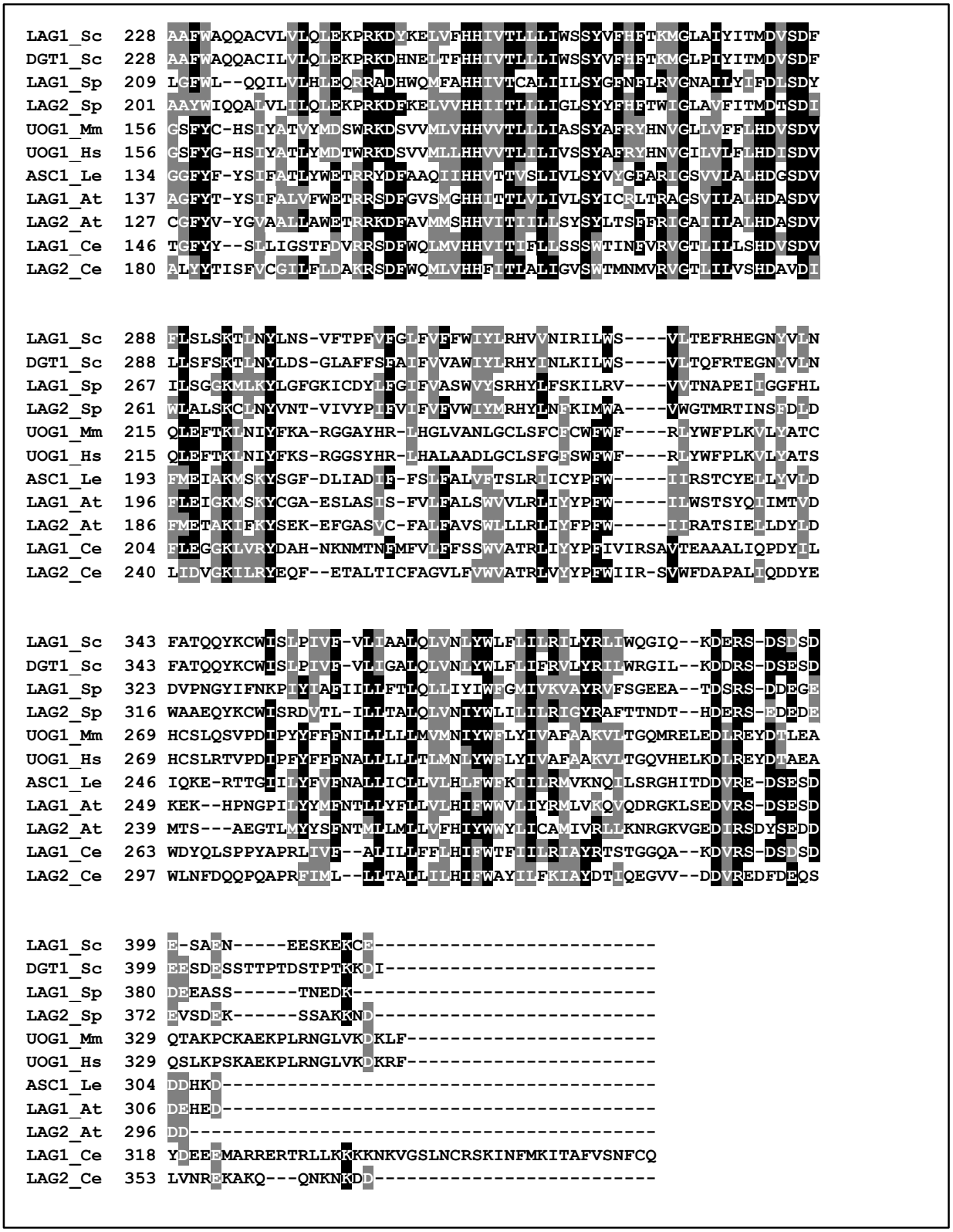


Abb. 3.2: Vergleich homologer Sequenzen der *LAG*-Familie. Die Abkürzungen der Proteinnamen sind in Abb. 3.1 aufgelistet. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des ClustalW-Algorithmus Vers. 1.7 berechnet. Identische Aminosäurereste sind schwarz und ähnliche grau hervorgehoben. Die Positions des jeweils ersten Aminosäurerests in der Primärsequenz ist am Anfang der entsprechenden Zeile dargestellt.

Im Zusammenhang mit den mutmaßlichen EST-kodierten Proteinen (Abb. 3.1) kristallisierten sich näher betrachtet einige identische oder ähnliche Aminosäuren heraus, die an dieser Position des *LAG*-Motives in allen Homologen hochkonserviert vorhanden sind (Abb. 3.3).

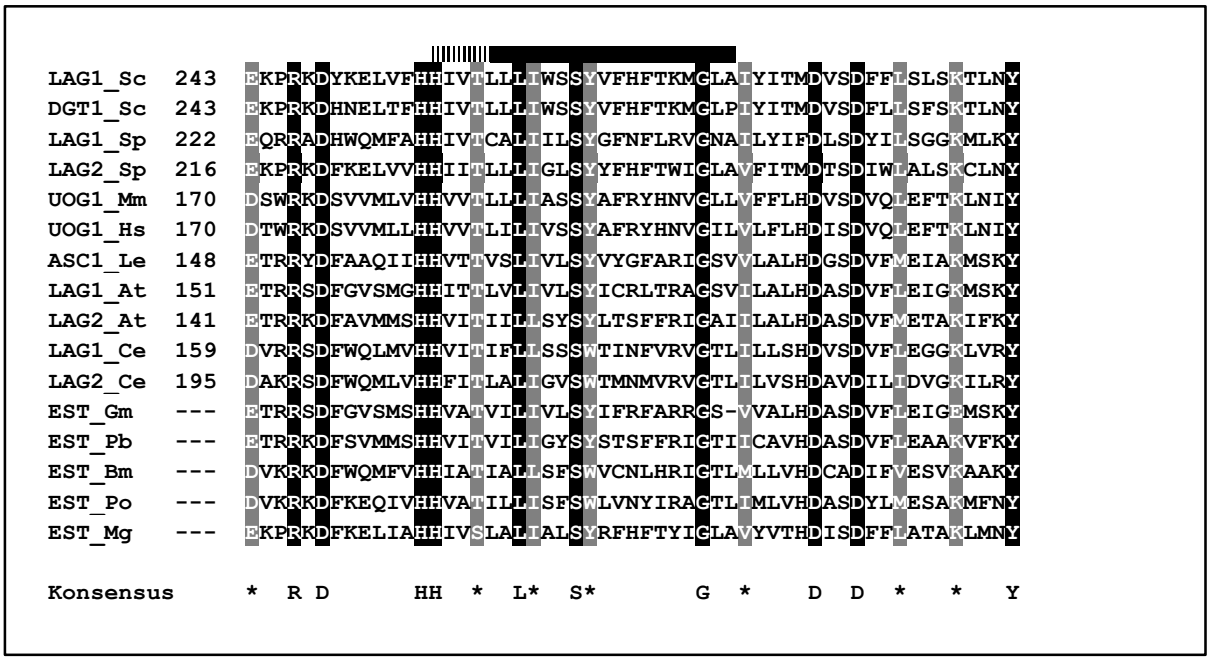


Abb. 3.3: Sequenzvergleich des *LAG*-Motives aus verschiedenen Organismen. Die Abkürzungen der Proteinnamen sind in Abb. 3.1 aufgelistet. Die Positions des jeweils ersten Aminosäurerests in der Primärsequenz ist am Anfang der entsprechenden Zeile dargestellt. Identische Aminosäurereste, die an dieser Position im *LAG*-Motiv in allen Homologen vokommen, sind schwarz sowie ähnliche Aminosäurereste grau hinterlegt. In der letzten Zeile ist die Konsensussequenz der identischen (als Buchstaben) als auch der ähnlichen (als Stern) Aminosäurereste aufgeführt. Der schwarze Balken oberhalb des Sequenzblocks indiziert die Position einer vermeintlichen helikalen TMD.

Es war in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß sich im Transmembranbereich ein konserviertes Serin und ein Threonin/Serin als hydrophile Reste befinden. Interessanterweise stammen die identifizierten Homologe aus unterschiedlichen, eukaryontischen Familien wie Hefen (*S. cerevisiae*, *S. pombe*), Säugern (*M. musculus*, *H. sapienes*), Pflanzen (*L. esculentum*, *A. thaliana*, *G. max*, *P. balsamifera*), Nematoden (*C. elegans*), Pilzen (*M. grisae*), Fischen (*P. olivaceus*) und Insekten (*B. mori*). Angesichts der

Tatsache, daß bisher in keinem Prokaryonten, wohl aber in vielen Eukaryonten homologe Proteine zu Lag1p identifiziert wurden, ist es naheliegend, daß die Biochemie der *LAG*-Proteine eine zwar grundlegende, aber eukaryontenspezifische ist. Aufgrund der relativ nahen Verwandschaft von Lag1p/Dgt1p aus *S. cerevisiae* zu den Homologen UOG1 aus *H. sapiens* und *M. musculus* (Abb. 3.4) können die Ergebnisse einer Funktionsanalyse in Hefe im wesentlichen auch auf Säugerzellen angewandt werden.

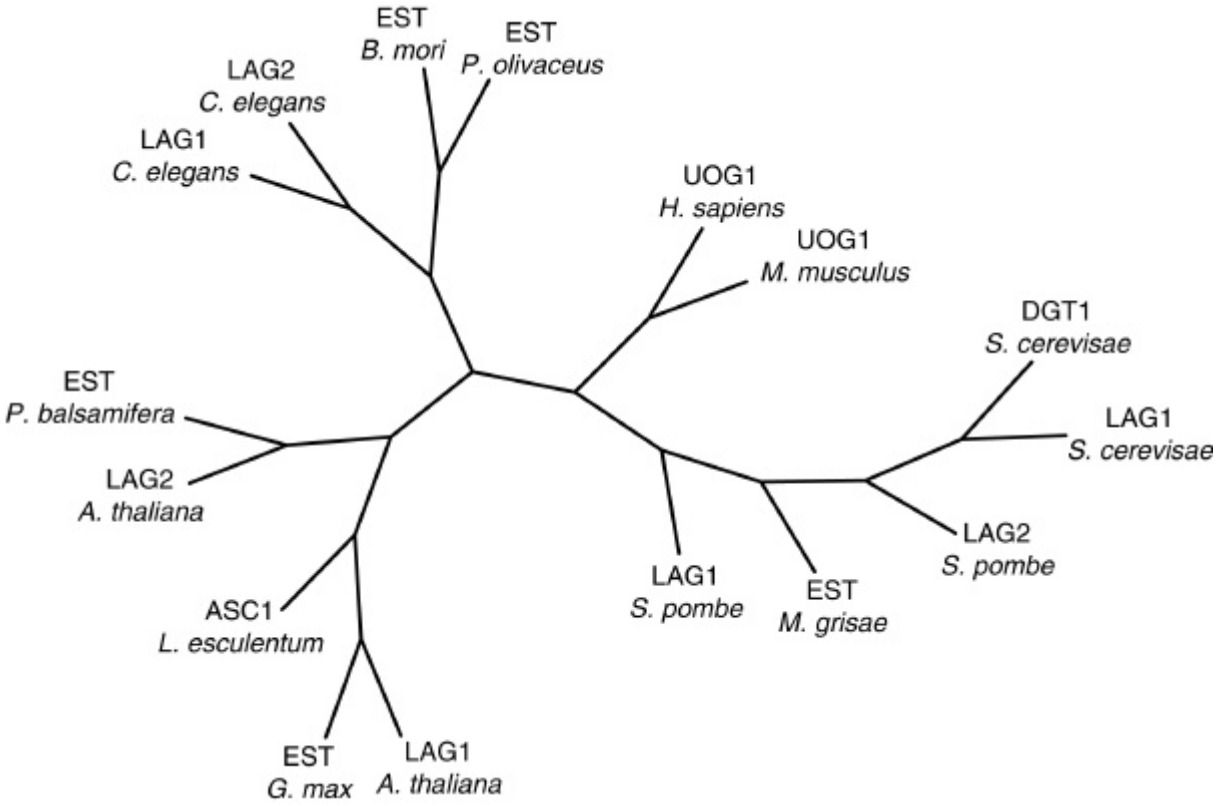


Abb. 3.4: Phylogenetischer Stammbaum der *LAG*-Proteine. Die Berechnung der relativen Verwandschaft erfolgte mit dem ClustalW-Algorithmus Vers. 1.7 und die Darstellung mit dem Programm Phylib. Die Wegstrecken entsprechen nicht der zeitlichen Divergenz während der Evolution sondern spiegeln den relativen Verwandschaftsgrad der Proteine wieder.

Diese Tatsache begründete mit die Entscheidung, Lag1p und Dgt1p aus *S. cerevisiae* als Untersuchungsobjekte zur molekularen Analyse der *LAG*-Familie zu verwenden und

unterstrich einmal mehr die Bedeutung der Bäckerhefe als Modellorganismus für höhere Eukaryonten. Die starke Sequenzidentität von Lag1p und Dgt1p und die Tatsache, daß jedes der beiden Proteine den *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekt komplementieren kann (Barz und Walter, 1999), deuten auf redundante oder überlappende Funktionen hin. Die weiteren biochemischen Analysen wurden deshalb z.T. nur mit einem der beiden Proteine gemacht, die Rückschlüsse aber für beide gezogen.

3.1.2. Der N-Terminus von Dgt1p ist cytosolisch orientiert

Computerunterstützte Analysen der Primärsequenz von Lag1p und Dgt1p deuteten auf sechs oder sieben TMD hin (Abb. 3.5). Beide Proteine besitzen demnach einen löslichen N- und C-Terminus mit jeweils ca. 80 Aminosäuren (AS) bzw. ca. 50 AS . C-terminal ist ein charakteristisches Dilysinmotiv (KKXX oder KXKXX) vorhanden, welches üblicherweise durch Interaktion mit der cytoplasmatischen, retrograden COPI-Transportmaschinerie den Rücktransport ER-residenter Proteine sicherstellt (Nilsson *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1993; Gaynor *et al.*, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Townsley und Pelham, 1994; Cosson *et al.*, 1996; Harter *et al.*, 1996; Lewis und Pelham, 1996; Teasdale und Jackson, 1996; Orci *et al.*, 1997; Schroeder-Koehne *et al.*, 1998). Deshalb kann angenommen werden, daß der C-Terminus von Lag1p und Dgt1p ebenfalls cytosolisch orientiert ist. Um nähere Informationen über die Topologie von Lag1p und Dgt1p hinsichtlich der Anzahl ihrer TMD zu erlangen, wurde die N-terminale Orientierung der Polypeptidkette analysiert. Zu diesem Zweck wurde eine veränderte, aber funktionelle Version von Dgt1p verwendet, die zusätzlich ein HA-Epitop am N-terminalen Ende trägt (Dgt1p-Ha; Barz und Walter, 1999).

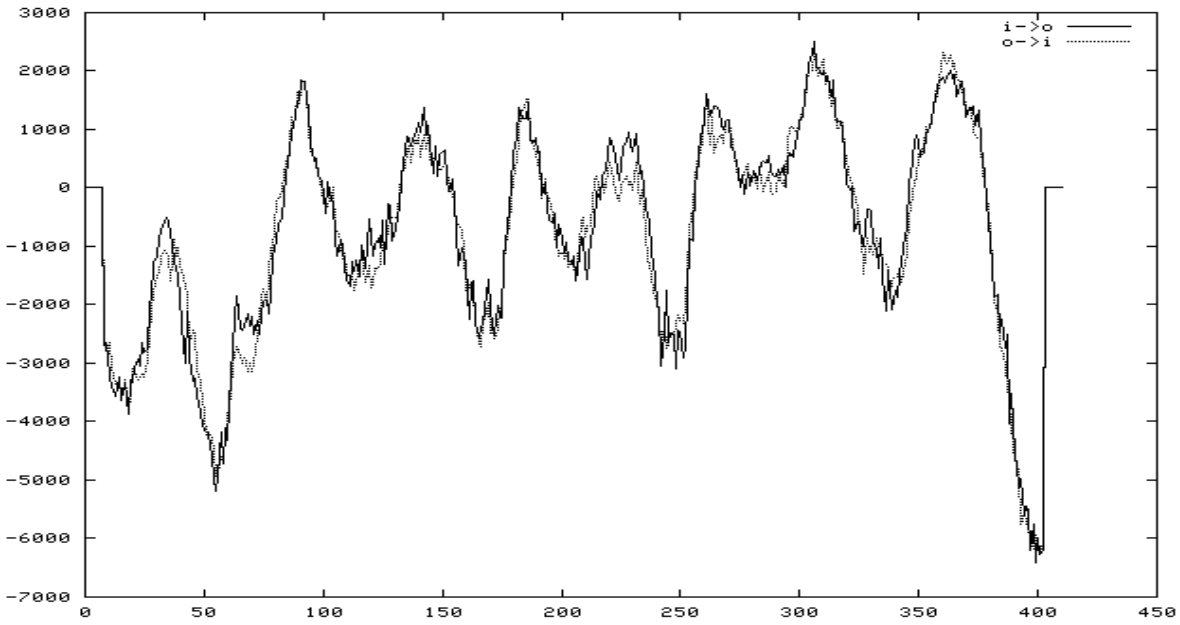


Abb. 3.5: Hydropathieplot von Lag1p. Der Plot wurde mit Hilfe des TMPred-Algorithmus (Hofmann und Stoffel, 1993) erstellt. Positive Werte auf der Ordinate stehen für hydrophobe, negative Werte für hydrophile Bereiche des Proteins. Die Höhe des Wertes gibt die statistische Wahrscheinlichkeit des Vorhersage an. Die fortlaufende Position der Aminosäuren ist auf der Abszisse angegeben. Die durchgezogene Linie gibt den Wert für einen cytosolisch-lumenalen, die gestrichelte Linie den Wert für einen lumenal-cytosolischen Membrandurchgang an.

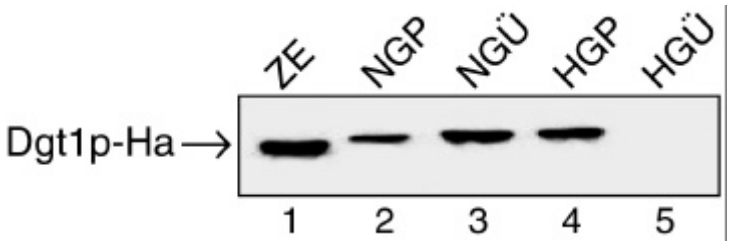


Abb. 3.6: Präparation mikrosomaler Membranen aus STY2.1. STY2.1-Zellen wurden in der frühen exponentiellen Phase geerntet, sphäroplastisiert, lysiert und bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand (NGÜ; Spur 3) wurde vom Zelldebris (NGP; Spur 2) getrennt und einer Hochgeschwindigkeitszentrifugation unterzogen. Der Überstand (HGÜ; Spur 5), das Pellet mit den angereicherten ER-Membranen (HGP; Spur 4), der Überstand und das Pellet der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation, sowie unfraktionierter Zellextrakt (ZE; Spur 1) wurden in äquivalenten Mengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot gegen das HA-Epitop analysiert.

STY2.1-Hefezellen, die neben der *dgt1*-Deletion ein centromeres Plasmid mit *DGT1-HA* besitzen, wurden in der exponentiellen Phase geerntet und anschließend mikrosomale Fraktionen präpariert (Abb. 3.6). Die angereicherten ER-Membranen wurden in unterschiedlichen Zeitintervallen mit oder ohne Detergenz (SDS) proteolytisch verdaut und die Ansätze mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.7). Als Markerprotein für die Unversehrtheit der ER-Kompartimente diente ER-lumenales Kar2p, ein lösliches Hitzeschockprotein (Hsp70) und Faltungshelfer (Simons *et al.*, 1995).

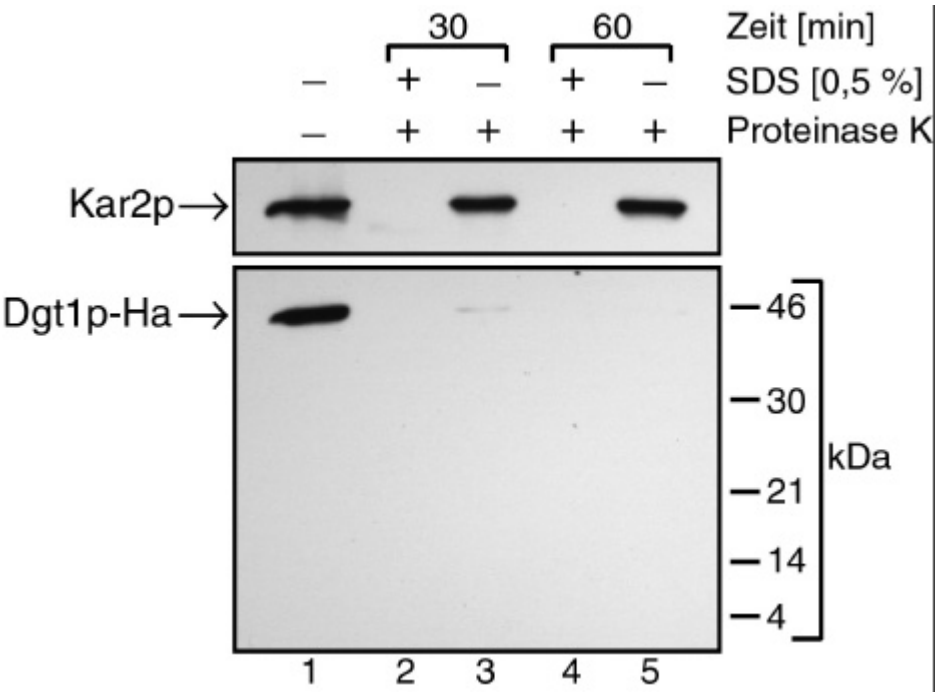
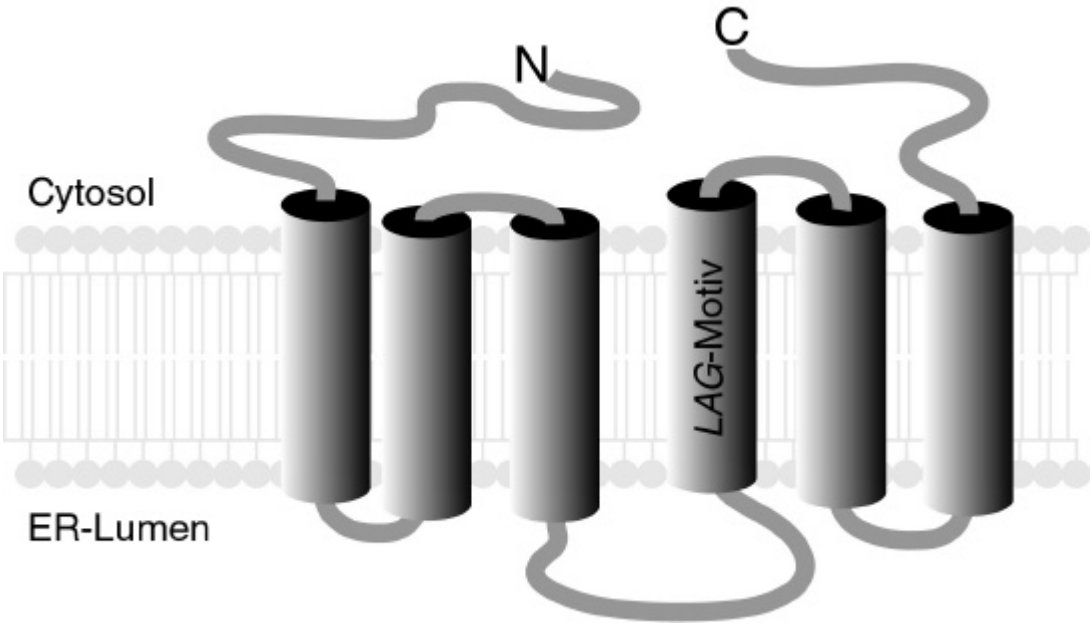


Abb. 3.7: Proteolytischer Verdau intakter ER-Kompartimente. Mikrosomale Membranen *DGT1-HA*-expremierender Zellen wurden präpariert und in der Gegenwart (Spur 2, 4) oder Abwesenheit (Spur 3, 5) von 0,5 % SDS mit Proteinase K bei 37 °C für 30 min (Spur 2, 3) bzw. 60 min (Spur 4, 5) inkubiert. In Spur 1 sind unbehandelte Membranen als Kontrolle aufgetragen. Die Reaktion wurde gestoppt und äquivalente Mengen mittels Western Blot mit anti-Kar2p- bzw. anti-HA-Antikörper analysiert. Die Werte des Größenmarkers sind links angegeben.

Betrachtet man das Schicksal von Kar2p in den verschiedenen Ansätzen, so sieht man deutlich, daß dieses lumenale Markerprotein in der Abwesenheit von Detergenz von der Proteinase auch nach 60 min Inkubation nicht beeinflußt und somit von den intakten Membranen geschützt wurde (Spur 3 und 5). In der Gegenwart von Detergenz hingegen verschwindet die entsprechende Bande auf dem Western Blot schon nach 30 min Inkubation (Spur 2, siehe auch Spur 4), eine Beobachtung, die auf eine komplette Disintegration der Membranen durch das Detergenz und dadurch auf eine Zugänglichkeit des Substrates für die Proteinase schließen läßt. Im Gegensatz dazu konnte das N-terminale Ha-Epitop von Dgt1p-Ha trotz der Unversehrtheit der Membranen nicht vor dem Verdau bewahrt werden, da die Intensität der entsprechenden Bande unter identischen Bedingungen auch ohne Detergenz nach 30 min größtenteils und nach 60 min komplett abnimmt (Spur 3 und 5). Die Anwesenheit von SDS bewirkte, wie erwartet, einen effizienten Verdau schon nach 30 min (Spur 2, siehe auch Spur 4). Falls der N-Terminus von Dgt1p-Ha lumenal orientiert wäre, sollte er, von den Membranen geschützt, aufgrund des Verdaus cytosolischer Proteinanteile auf eine Größe von ca. 12 kD inkl. Ha-Epitop und TMD reduziert werden. Da unter den getesteten Bedingungen trotz der Unversehrtheit der Kompartimentierung keine entsprechende oder zusätzliche Banden sichtbar werden, muß der N-Terminus von Dgt1p-Ha auf der cytosolischen Seite des ER liegen. Im Zusammenhang mit der Computeranalyse der Primärsequenz bedeutete dies, daß Lag1p und Dgt1p über sechs TMD verfügen. Ein Vergleich der Hydrophobizitätswerte aus Abb. 3.5 bescheinigte dem Bereich um die AS-Position 225 die geringste Warscheinlichkeit einer TMD. Als Quintessenz der bisherigen Daten und unter Zuhilfenahme verschiedener *in silicio*-Berechnungen illustriert Abb. 3.8 ein hypothetisches Modell der Sekundärstruktur von Lag1p und Dgt1p in der Membran des ER.



Helix-Nr.	1	2	3	4	5	6
Position AS	84 - 103	135 - 155	174 - 195	252 - 272	298 - 317	352 - 372
Wert	1844	980	1463	1548	2506	2319
TMD-Orientierung	Cytosol ↓ Lumen	Lumen ↓ Cytosol	Cytosol ↓ Lumen	Lumen ↓ Cytosol	Cytosol ↓ Lumen	Lumen ↓ Cytosol

Abb. 3.8: Hypothetische Sekundärstruktur von Lag1p/Dgt1p in der ER-Membran. Die Tabelle enthält die Berechnungen des TMpred-Algorithmus (Hoffmann und Stoffel, 1993) für die einzelnen TMD. TM-Helix 4 enthält das *LAG*-Motiv.

3.1.3. Der C-Terminus und nicht der N-Terminus von Dgt1p ist funktionell bedeutsam

Allen *LAG*-Proteinen ist neben dem *LAG*-Motiv auch ein konservierter C-terminaler Bereich gemein. Als besonderes Merkmal besitzt dieser Teil des Proteins einen ungewöhnlich hohen Anteil an Aspartaten und Glutamaten und scheint deshalb unter nativen Bedingungen negativ geladen vorzuliegen. Angesichts dieser sequenziellen Besonderheit stellte sich die Frage, ob dem C-Terminus eine essentielle Bedeutung für die Funktion des Proteins zugrunde

liegt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Dgt1p-Mutanten mit Deletionen des löslichen N-Terminus, des C-Terminus (das Dilysinmotiv blieb erhalten) oder mit einem Austausch der zwei Lysine in der KKXX-Sequenz zu Leucin und Glutamin gentechnisch hergestellt. Als Indiz für die Funktionsfähigkeit wurden die *DGT1*-Mutanten in *lag1*Δ*dgt1*Δ transformiert und die Fähigkeit zur Wachstumskomplementation getestet (Abb. 3.9).

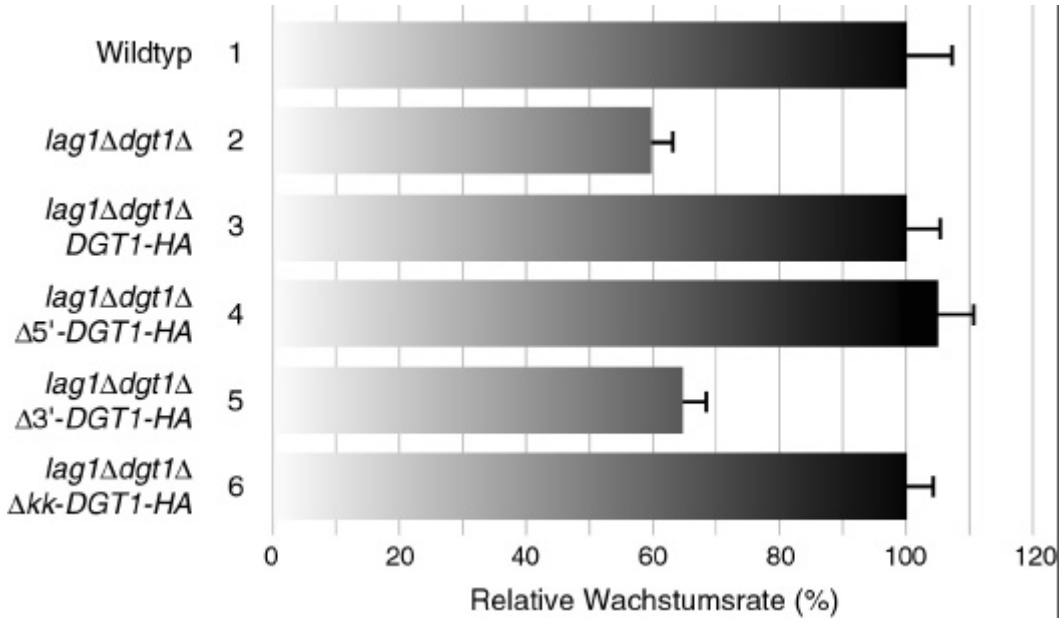


Abb. 3.9: Fähigkeit verschiedener *DGT1*-Mutanten zur Komplementation des *lag1*D*dgt1*D-Wachstumsdefekts. Wildtyp *DGT1-HA* (3), *DGT1-HA* mit 5'-Deletion (4), *DGT1-HA* mit 3'-Deletion (5) und *DGT1-HA* mit Mutation im Bereich des kodierten Dilysinmotives (6) wurden in *lag1*Δ*dgt1*Δ transformiert und die Wachstumsrate bei 30 °C im Vergleich zum Wildtyp (1; 100 %) sowie *lag1*Δ*dgt1*Δ gemessen.

Die korrekte Expression aller Konstrukte wurde anhand ihrer Größen im Western Blot gegen das Ha-Epitop bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Wachstumsrate des Wildtyps liegt als Referenzwert fix bei 100 %. In Übereinstimmung mit früheren Analysen wächst der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletionsstamm mit einer auf ca. 60 % reduzierten Wachstumsrate. Die Deletion der 80 N-terminalen Aminosäuren beeinträchtigt die Funktionsfähigkeit von Dgt1p-

Ha hingegen nicht, da das entsprechend verkürzte Gen den Wachstumsdefekt der Doppelmutante voll zu komplementieren vermag. Im Gegensatz dazu ist die Zellteilungsrate von *lag1*Δ*dgt1*Δ, transformiert mit der 3'-deletierten Version von *DGT1-HA*, identisch zu jener der unkomplementierten Doppelmutante. Dies bedeutet einerseits, daß der C-Terminus essentiell für die Funktion von Dgt1p ist. Da diese verkürzte Proteinvariante aber immer noch die KKXX-Sequenz besitzt, scheint andererseits die Abwesenheit der Funktionalität nicht in einer fehlerhaften Lokalisation des Proteins begründet zu sein. Letztere Annahme wird durch zwei Tatsachen verstärkt. Zum Einen zeigt eine Mutation des Dilysinmotives keine Beeinträchtigung der Fähigkeit von Δ*kk*-Dgt1p-Ha zur Rettung des *lag1*Δ*dgt1*Δ-Deletionsphänotyps (Reihe 6). Zum Anderen konnten im C-terminalen Bereich von Lag1p oder Dgt1p keinerlei Motive identifiziert werden, die sequenzielle Ähnlichkeit zu der alternativen Retentionssequenz, basierend auf aromatischen Resten, aufweisen (Cosson *et al.*, 1998). Zusammenfassend läßt sich deshalb sagen, daß der negativ geladene C-Terminus essentiell für die Funktion von Lag1p und Dgt1p ist.

3.1.4. Dgt1p residiert ausschließlich in der ER-Membran

Barz und Walter (1999) stellten hinsichtlich einer möglichen Funktion von Lag1p und Dgt1p zwei Hypothesen auf. Eine davon ging auf die Beobachtung zurück, daß die Transportrate GPI-verankerter Proteine vom ER zum Golgi in *ret1-1*, eines Hefestammes mit einer temperatursensitive Mutante in der α-Untereinheit des COPI-Komplexes (Orci *et al.*, 1986; Rothman und Orci, 1992), stark herabgesetzt ist (Sütterlin *et al.*, 1997). Da überdies bekannt ist, daß GPI-verankerte Proteine das ER in COPII-Vesikeln verlassen (Doering und Schekman, 1996), spekulierten die Autoren über eine Rolle des COPI-Komplexes im

retrograden Transport und somit der Bereitstellung eines mutmaßlichen Faktors für den anterograden Transport GPI-verankerter Proteine. Lag1p und Dgt1p waren deshalb mögliche Kandidaten für diese(n) Faktor(en) unter der Prämisse ihres zyklischen Transports zwischen ER und Golgi. Falls sie aber als Transportfaktoren fungierten, wären sie zum einen von ihrem Rücktransport zum ER abhängig und zum anderen ein konstitutiver Bestandteil der anterograden COPII-Transportvesikel. Die Analysen im vorhergehenden Kapitel schlossen eine Bedeutung des Retentionssignals KKXX für die Funktion von Dgt1p aus und stellten deshalb die Hypothese des GPI-Transportfaktors in Frage. Da aber ein alternativer, KKXX-unabhängiger Rücktransport von Lag1p und Dgt1p nicht ausgeschlossen werden konnte, mußte das Vorkommen von Dgt1p-Ha in COPII-Vesikeln untersucht werden.

Zur Produktion und Isolierung von COPII-Vesikeln diente das von Wuestehube und Schekman (1992) entwickelte *in vitro*-System, welches die Formierung von Vesikeln ausgehend von ER-Membranen in Abhängigkeit von Cytosol, GTP und eines ATP-regenerierenden Sytems beschreibt. STY2.1-Zellen, welche eine *dgt1*-Deletion besitzen und *DGT1-HA* von einem centromeren Plasmid unter der Kontrolle des nativen Promotors expremieren, wurden dafür in der exponentiellen Phase geerntet und nach enzymatischem Verdau der Zellwand osmotisch lysiert. Die Aufreinigung der ER-Membranen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Als Ressource für die cytosolischen Komponenten diente der Ultrazentrifugationsüberstand eines kompletten Wildtyplysats. Zur Vesikelproduktion wurden die Membranen mit dem Cytosol, dem ATP-regenerierenden System und GTP inkubiert und anschließend die Donormembranen von den Vesikeln mittels differentieller Zentrifugation getrennt. Als Negativkontrolle erfolgte die Reaktion entweder in der Abwesenheit von Cytosol, mit Apyrase anstelle des ATP-regenerierenden Systems oder bei 4 °C. Alle aufgeführten Modifikationen sind als Inhibitoren der Vesikelfission beschrieben (Wuestehube

und Schekman, 1992). Die einzelnen Ansätze wurden schließlich mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.10).

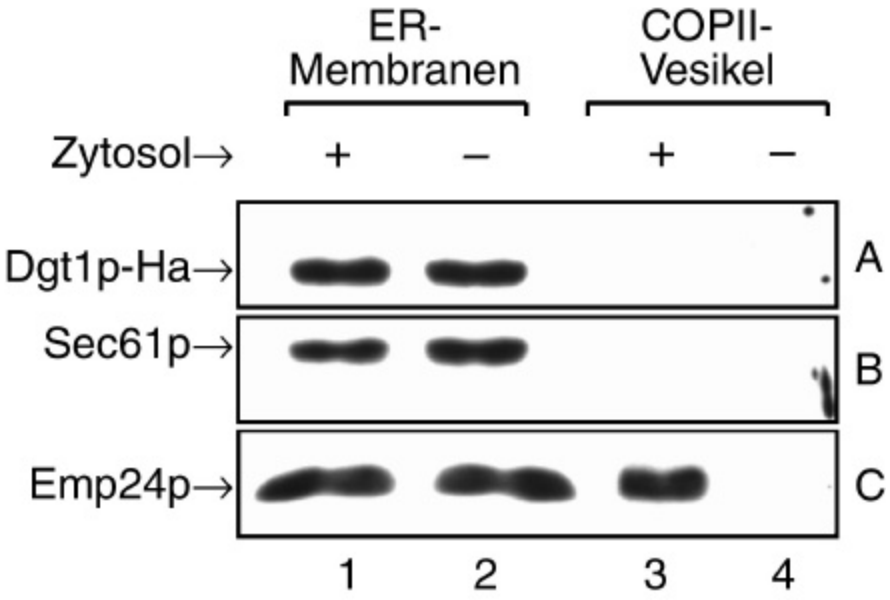


Abb. 3.10: Analyse *in vitro*-generierter COPII-Vesikel. ER-Membranen wurde mit einem ATP-regenerierenden Sytem, GTP und in der Anwesenheit (Spur 1 und 3) oder Abwesenheit (Spur 2 und 4) von Cytosol inkubiert. Die Ansätze wurden differentiell zentrifugiert und die Membran- (Spur 1 und 2) und Vesikelfraktion (Spur 3 und 4) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte im Western Blot unter Verwendung von anti-Ha- (A), anti-Sec61p- (B) oder anti-Emp24p-Antikörper (C).

Als Referenzproteine zur korrekten Interpretation der Ergebnisse dienten einerseits Sec61p, welches als Teil des Translokons in der ER-Membran residiert und nicht in Transportvesikeln zu finden ist (Deshaies und Schekman, 1987; Simon und Blobel, 1991; Crowley *et al.*, 1994; Kuehn *et al.*, 1998), und andererseits Emp24p, als membrangebundener Cargorezeptor ein konstitutiver Bestandteil ER-generierter COPII-Transportvesikel (Schimmoeller *et al.*, 1995; Kuehn *et al.*, 1998). Verfolgt man das Schicksal von Emp24p in diesem zellfreien Transportsystem, so identifiziert man eine entsprechende Bande sowohl in der ER-Membranfraktion als auch in der mit Cytosol inkubierten Vesikelfraktion (C; Spur 1-

3). Ohne Cytosol hingegen wurden keine Vesikel gebildet (C; Spur 4). Diesselbe Aussage trifft auch auf die übrigen Negativkontrollen zu (Daten nicht gezeigt). Das ER-Protein Sec61p kann im Gegensatz zu Emp24p nur in der ER-Membranfraktion und nicht in Vesikeln detektiert werden (B; Spur 1 und 2) und bescheinigt somit der Vesikelfraktion eine ER-freie Qualität. Analysiert man nun das Vorkommen von Dgt1p-Ha in den einzelnen Fraktionen, so gleicht die Verteilung dieses Proteins der von Sec61p und nicht der des Cargorezeptors Emp24p, da Dgt1p-Ha in der Vesikelfraktion nicht nachzuweisen ist (A). Somit scheint Dgt1p-Ha, wie Sec61p, nur in der Membran des ER vorzukommen. Diese Beobachtung schließt zusammen mit der Erkenntnis, daß das Dilysinmotiv für die Funktion von Dgt1p ohne offensichtliche Bedeutung ist, einen konstitutiv zyklischen Transport von Lag1p und Dgt1p aus. Dies bedeutet gleichzeitig aber auch, daß beide Proteine nicht als Transportfaktoren fungieren können und deshalb dem verlangsamten Transport GPI-verankerter Proteine in *lag1*Δ*dgt1*Δ eine andere Ursache zugrunde liegt.

3.1.5. Lag1p und Dgt1p interagieren in der ER-Membran

Lag1p und Dgt1p besitzen zueinander eine ausgeprägte Sequenzidentität von ca. 70 %. Darüberhinaus können beide Proteine den *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekt im gleichen Maße komplementieren, sodaß sie höchstwahrscheinlich über redundante oder überlappende Funktionen verfügen. Aufgrund dieser Annahme entstand die Idee, daß Lag1p und Dgt1p in der Membran des ER wechselwirken und somit einen funktionellen, heteropolymeren Komplex ausbilden.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein neuartiges Plasmid verwendet, welches die gleichzeitige Expression zweier offener Leserahmen unter der Kontrolle des bidirektionalen und reprimierbaren Promotors *GAL1/10* erlaubt. Überdies ermöglichte eine gezielte Klonierung in die zwei multiplen Klonierungsbereiche des Vektors ein Anhängen zweier unterschiedlicher Epitope an das 3'- oder 5'- Ende der entsprechenden Gene. Auf diese Art und Weise wurde Lag1p mit einem N-terminalen *c-myc*-Epitop und Dgt1p mit einem ebenfalls N-terminalen *flag*-Epitop versehen. Nach Expression beider Gene (Stamm STY23) oder nur von *DGT1-FLAG* (Stamm STY25) als Negativkontrolle wurden die Zellen geerntet und anschließend angereicherte ER-Membranen präpariert. Ein erster Vorversuch sollte die günstigsten Solubilisierungsbedingungen für Lag1p und Dgt1p feststellen. Die Membranen wurden in der Gegenwart der Detergenzien 9E10, Dodecylmaltosid (DM), Triton X-100 oder Digitonin einer kalten Extraktion und anschließend einer Ultrazentrifugation unterzogen. Das Pellet und der Überstand wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Präsenz von Lag1p-Myc im Vergleich zu den integralen Membranproteinen Sec61p und Emp24p untersucht (Abb. 3.11). Das Signal von Lag1p-Myc verteilt sich nach der Solubilisierung mit den verschiedenen Detergenzien zu deutlich unterschiedlichen Anteilen im Pellet und Überstand. 0,3 % DM pro mg Membranprotein scheint die günstigste Bedingung für die Immunpräzipitation zu sein, da sie aufgrund der gleichmäßigen Verteilung von Lag1p-Myc im Überstand und Pellet einen Erhalt der Protein-Protein-Wechselwirkungen der solubilisierten Proteine verspricht. Obwohl Digitonin Lag1p und Dgt1p mit einer ähnlichen Effizienz wie Dodecylmaltosid extrahiert, wurde DM aufgrund der einfacheren und ungefährlicheren Handhabung der Vorzug für den weiteren Versuchsverlauf gegeben.

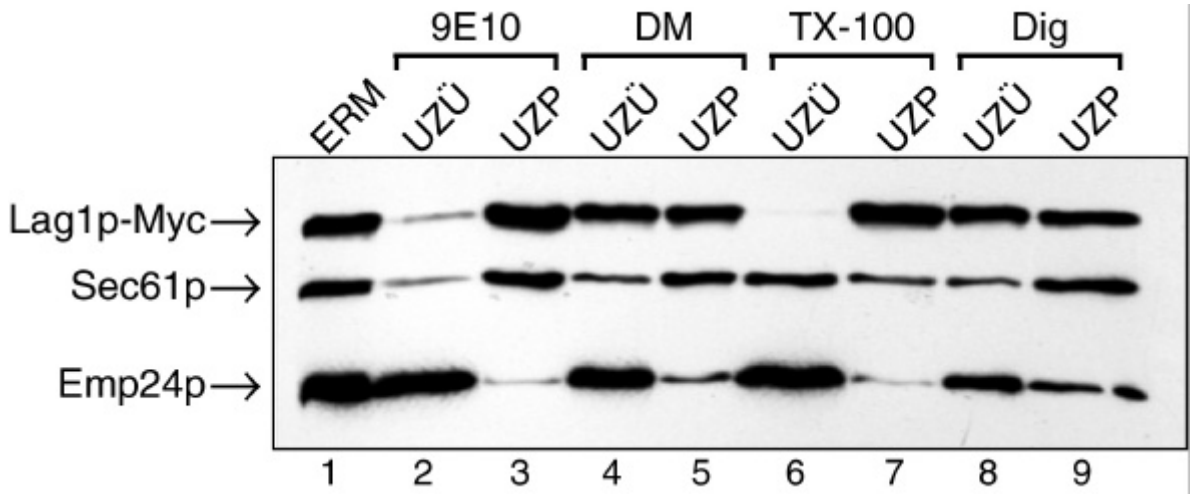


Abb. 3.11: Solubilisierungsreihe von Lag1p-Myc im Vergleich integraler Membranproteine. Mikrosomale Fraktionen aus STY25 (1 mg/ml) wurden wurden mit den Detergenzien 9E10 (1 %; Spur 2 und 3), Dodecylmaltosid (0,3 %; Spur 4 und 5), Triton X-100 (1 %; Spur 6 und 7) oder Digitonin (1 %; Spur 8 und 9) in der Kälte für 60 min solubilisiert und die Ansätze anschließend min 100000×g abzentrifugiert. Die Überstände (UZÜ; gerade Spurennummerierung) und die Niederschläge (UZP; ungerade Spurennummerierung) sowie unbehandelte Membranen (ERM; Spur 1) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop, Sec61p und Emp24p analysiert.

Im Gegensatz zu anderen, integralen Membranproteinen wie Sec61p oder Emp24p ist Lag1p-Myc in milderen Detergenzien wie CHAPS, OG oder 9E12 kaum und unter Verwendung von Triton X-100 interessanterweise gar nicht löslich. Ähnliche Beobachtungen in Säugerzellen (Brown und Rose, 1992), Hefezellen (Kuebler *et al.*, 1996) oder artifiziellen Membranen (Schroeder *et al.*, 1994) wurden auf eine Resistenz sphingolipid- und cholesterol/ergosterol-reicher Membrandomänen genenüber kalter Extraktion mit Triton-X-100 zurückgeführt.

In einem größeren Ansatz wurden die Membranen schließlich mit 0,3 % DM extrahiert, der Überstand nach Ultrazentrifugation für die Immunpräzipitation mit anti-Myc-Antikörper verwendet und die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot gegen das Myc- oder Flag-Epitop getestet (Abb. 3.12).

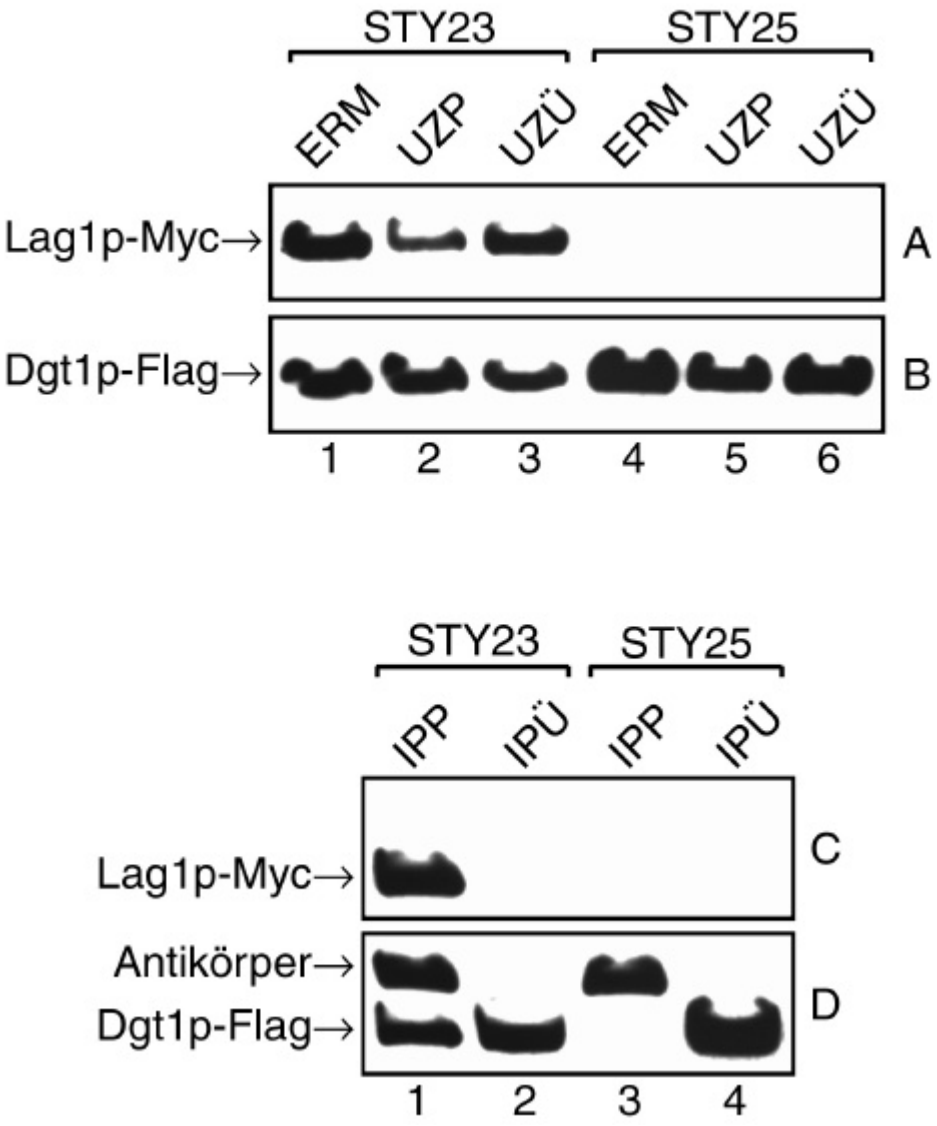


Abb. 3.12: Coimmunpräzipitation von Lag1p-Myc und Dgt1p-Flag aus solubilisierten ER-Membranen. *DGT1-FLAG* wurde zusammen mit (STY23) oder ohne *LAG1-MYC* (STY25) expremiert und angereicherte ER-Membranen (ERM) präpariert. Nach Solubilisierung der Membranen in 0,3 % DM pro mg Membranprotein wurden die Fraktionen mit 100000×g zentrifugiert und das Pellet (UZP) sowie der Überstand (UZÜ) auf die Solubilisierungseffizienz mittels SDS-PAGE und Western Blot mit anti-Myc- (A) oder anti-Flag-Antikörper (B) getestet. Beide Überstände wurden für die Immunpräzipitation mit anti-Myc-Antikörper hergenommen und das Pellet (IPP) sowie der Überstand (IPÜ) im Western Blot gegen das Myc- (C) oder das Flag-Epitop (D) analysiert.

Wie in Abb. 9C (Spur 1 und 2) dargestellt ist, konnte Lag1p-Myc quantitativ präzipitiert werden, da die entsprechende Bande nur im Pellet und nicht im Überstand detektierbar ist. In Abwesenheit des Myc-Epitops hingegen (Spur 3 und 4) erscheint kein Signal, was augenscheinlich in einer hohen Spezifität des verwendeten anti-Myc-Antikörpers begründet liegt. Betrachtet man das Los von Dgt1p-Flag in diesem Experiment (Abb. 9D), so läßt sich deutlich eine Coimmunpräzipitation von etwa der Hälfte des vorhandenen Dgt1p-Flag mit Lag1p-Myc erkennen (Spur 1 und 2). Die restliche Hälfte verblieb im Überstand. Das Fehlen eines entsprechenden Signals in Abwesenheit des Myc-Epitops verdeutlicht ein weiteres Mal die Spezifität des Antikörpers und so auch die der Lag1p-Dgt1p-Wechselwirkung (Spur 3 und 4). Aufgrund der artifiziellen Beschaffenheit des verwendeten Expressionssytems können keine Angaben zur Stöchiometrie der Interaktion von Lag1p und Dgt1p gemacht werden.

3.2. Die Funktion von Lag1p und Dgt1p in der Biosynthese von Sphingolipiden

Die Analysen zur Bedeutung des Dilysinmotives (Kap. 3.1.3) sowie der genauen, subzellulären Lokalisation von Lag1p und Dgt1p (Kap. 3.1.4) schlossen eine direkte Beteiligung beim Transport GPI-verankerter Proteine aus. Eine zweite Hypothese zur Funktion von Lag1p und Dgt1p beleuchtete eine Rolle in der Sphingolipidbiosynthese (Barz und Walter, 1999). Zwei Beobachtungen, welche GPI-verankerte Proteine und Sphingolipide in einen zellulären Kontext brachten, begründeten im wesentlichen diese Annahme. Wie einleitend bereits erwähnt, interagieren GPI-verankerte Proteine und Glykosphingolipide in der Plasmamembran von Säugerzellen (Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Varma und Mayor, 1998), eine Wechselwirkung, die während des sekretorischen Weges ab dem Golgi stattzufinden scheint und die korrekte Lokalisation von GPI-verankerten Proteinen vermittelt (Muniz und Riezman, 2000). In Hefe ist SPT-Aktivität, also die Synthese des Grundbausteins für Sphingolipide, essentiell für den Transport GPI-verankerter Proteine vom ER zum Golgi (Horvath *et al.*, 1994; Sütterlin *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sollte die Synthese dieser speziellen Lipidklasse in Abhängigkeit von *LAG1* und *DGT1* näher untersucht werden.

3.2.1. Die Synthese inositolhaltiger Sphingolipide ist drastisch reduziert in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1*

Um erste Informationen über die Sphingolipidbiosynthese in *lag1*Δ*dgt1*Δ zu gewinnen, wurde die Synthese inositolhaltiger Lipide unter nativen Bedingungen analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit [^{3}H]-Inositol ([^{3}H]-INO) pulsmarkiert und für den

angegebenen Zeitraum mit einem Überschuß an kaltem Inositol weiter inkubiert. Die extrahierten Lipide wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert (Abb. 3.13). Wildtyp-Lipidextrakte können nach dieser Methode üblicherweise in zehn radioaktive Banden, anhand authentischer Standards in Reihenfolge ihrer Hydrophobizität als PI (A und B), IPC (C=III und D=IV), MIPC (H), lyso-PI (F und G) und $M(IP)_2C$ (H) identifiziert, aufgetrennt werden (Spur 1). Die relative Intensität der einzelnen Banden zueinander war reproduzierbar. Die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante zeigt hingegen ein komplett verändertes Muster (Spur 2), insofern als die entsprechenden Banden von IPC-IV und $M(IP)_2C$ von geringerer Intensität und die von PI/B und IPC-III nicht vorhanden sind. Im Gegensatz dazu scheinen PI/A und lyso-PI/FG in einem vergleichweise hohen Maß synthetisiert zu werden. Darüberhinaus können in *lag1*Δ*dgt1*Δ Lipide identifiziert werden, welche im Wildtyp nicht oder in einer geringeren Menge vorhanden sind (Spur 2, mit einem Stern markiert). Es zeigte sich dabei, daß die Bande oberhalb von PI/A sensitiv gegenüber milder, alkalischer Hydrolyse ist. Diese Reaktivität verdeutlicht den Acylglycerol-Charakter des entsprechenden Lipids und schließt ein Ceramidderivat aus. Die unidentifizierte Bande unterhalb von lyso-PI/G bleibt dagegen unter alkalischen Bedingungen stabil (Daten nicht gezeigt; siehe später). Die Transformation der Mutante mit plasmidkodiertem *LAG1* oder *DGT1* revertiert den Deletionsphänotyp hinsichtlich der Sphingolipidbiosynthese komplett zugunsten des Wildtyp-Phänotyps (Spur 3 und 4). Die Anwesenheit beider Gene hat keinen verstärkenden oder sonstigen Effekt auf die Lipidqualität sowie -quantität (Spur 5) und beleuchtet damit die redundante Funktion von Lag1p und Dgt1p.

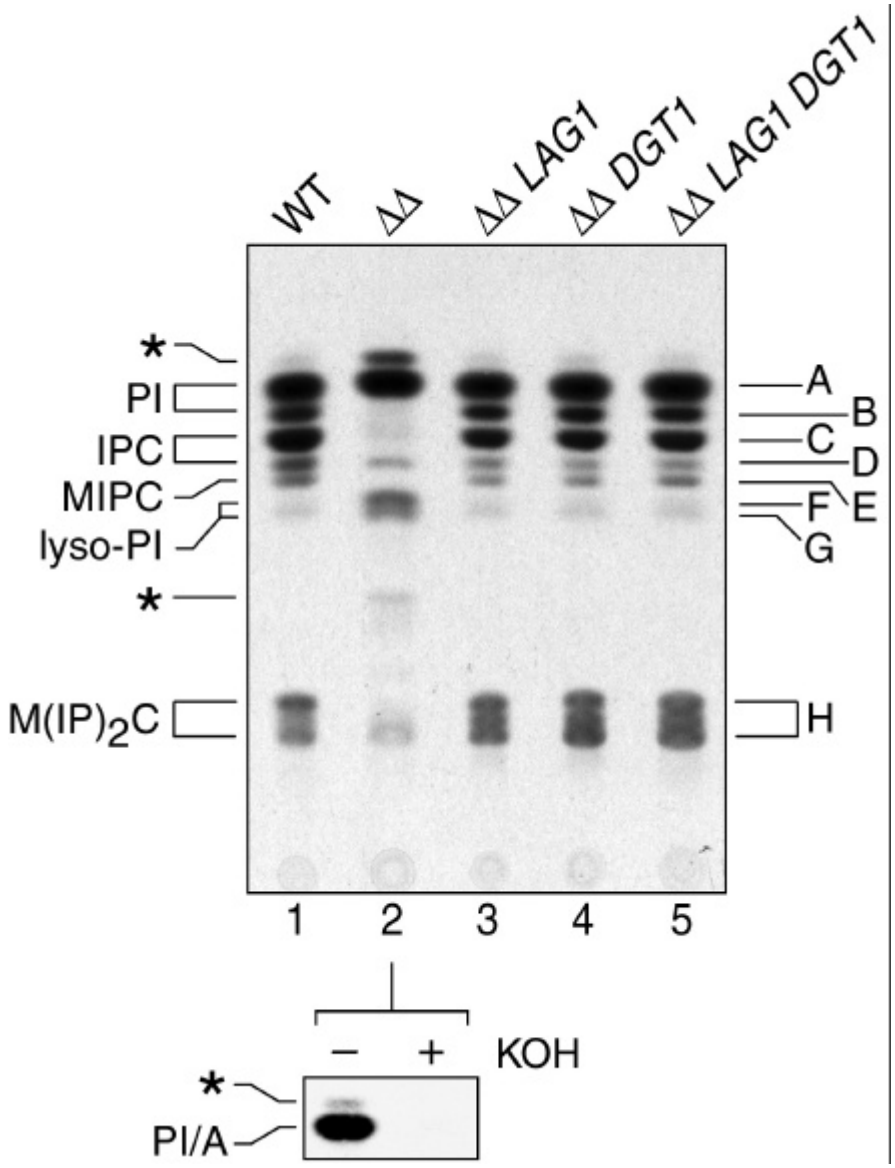


Abb. 3.13: Synthese inositolhaltiger Lipide in Abhängigkeit von *LAG1* und *DGT1*. Wildtypzellen (WT; Spur 1), *lag1*Δ*dgt1*Δ (ΔΔ; Spur2), *lag1*Δ*dgt1*Δ komplementiert mit plasmidkodierten *LAG1* (ΔΔ *LAG1*; Spur 3), *DGT1* (ΔΔ *DGT1*; Spur 4) oder beiden Genen (ΔΔ *LAG1 DGT1*; Spur 5) wurden in der expentiellen Phase geerntet, 3 ODml in 600 µl SC-Medium ohne Inositol resuspendiert und 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µCi [^{3}H]-Inositol für 20 min markiert und nach Zugabe von 620 µl YPD inkl. 80 µg/ml Inositol für weitere 60 min inkubiert. Gesamtlipidextrakte wurden entsprechend der Anleitung im Kapitel 5.5.2 präpariert, mittels DC (LMA) aufgetrennt und mit Hilfe von Fluorographie visualiert. Der untere Teil zeigt einen Ausschnitt aus dem Bereich um PI/A von *lag1*Δ*dgt1*Δ vor und nach milder, alkalischer Hydrolyse. Die Identifikation der Lipide erfolgte mittels authentischer Standards. Nicht identifizierte Lipide sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.2.2. *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen besitzen reduzierte Mengen inositolhaltiger Sphingolipide

Die Analysen im vorhergehenden Kapitel zeigen einen Defekt der Sphingolipidbiosynthese in *lag1*Δ*dgt1*Δ auf, denn es können keine oder nur geringste Spuren von Sphingolipiden identifiziert werden. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der bisherigen Annahme, daß zumindest die Anwesenheit von ausreichend IPC für das Überleben von Hefezellen notwendig sei (Wells und Lester, 1983; Pinto *et al.*, 1986). Da die Pulsmarkierung der Doppelmutante nur Informationen über die Syntheserate zu einem bestimmten Zeitpunkt geben kann, wurden im nächsten Schritt die absoluten Mengen von Sphingolipiden in *lag1*Δ*dgt1*Δ gemessen und charakterisiert.

Zur Bestimmung der absoluten Lipidmengen wurden die Zellen mit [^{32}P]-Phosphat ([^{32}P]-P) inkubiert, die extrahierten Lipide über DC aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert (Abb. 3.14). Die absoluten Mengen inositolhaltiger Sphingolipide in *lag1*Δ*dgt1*Δ sind im Vergleich zum Wildtyp verringert, wenn auch nicht so dramatisch wie es die reduzierten Syntheseraten andeuteten. Der Level von $M(IP)_2C$ ist in der Mutante um etwa 35 %, der von IPC-III um über 95 % im Vergleich zum Wildtyp geringer. IPC-IV scheint dagegen in *lag1*Δ*dgt1*Δ etwas stärker synthetisiert zu werden, beide IPC zusammen ergeben ca. 12 % des Wildtypwerts. Von der Quantifizierung von MIPC wurde abgesehen, da in der Mutante vermehrt unidentifizierte Banden detektierbar sind, die mit einem ähnlichen R_f-Wert wie MIPC laufen aber kein Mannose enthalten (siehe später). Subjektive Schätzungen ergeben für dieses Sphingolipid ähnliche Mengen wie im Fall von IPC.

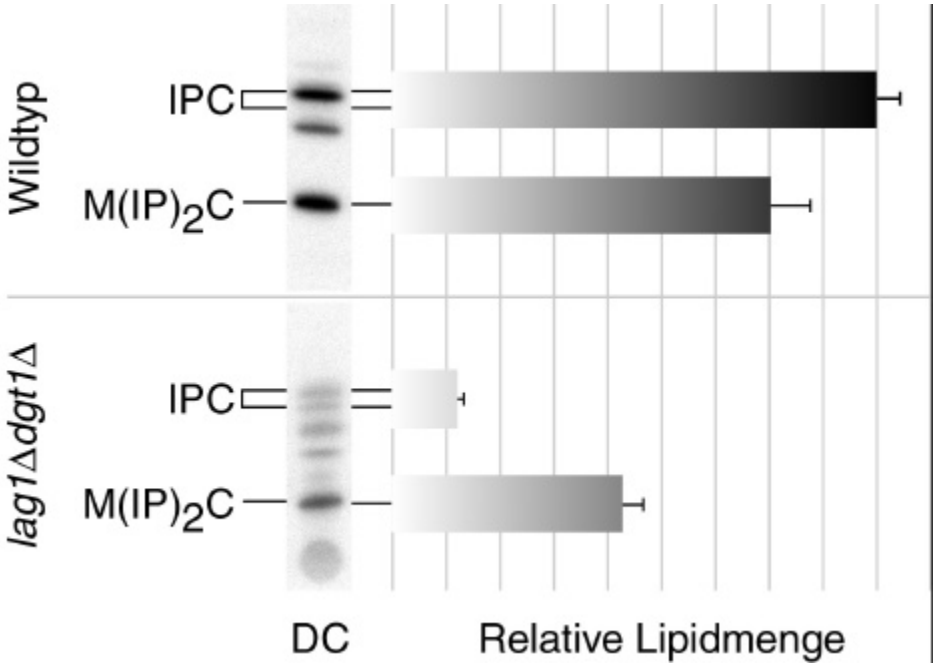


Abb. 3.14: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in Wildtyp und *lag1*D*dgt1*D. Die Zellen wurden über Nacht in 1 ml YPD inkl. 100 µCi [^{32}P]-Phosphat bis zur späten exponentiellen Phase angezogen, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und nach Entsalzung äquivalente Mengen mittels DC (Laufmittel B) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden erst autoradiographisch visualisiert (DC) und anschließend mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgewertet. Die relativen Werte sind als Querbalken dargestellt. IPC-III und IPC-IV wurden als IPC zusammengefaßt. Von der Quantifizierung von MIPC wurde abgesehen, da in der Mutante Lipide mit einem ähnlichen R_f-Wert gebildet wurden, welche aber keine Mannose enthielten (siehe später).

3.2.3. IPCerS-Aktivität ist in *lag1*D*dgt1*D vorhanden

Aufgrund der geringeren Sphingolipidmengen sowie der stark reduzierten Syntheseraten inositolhaltiger Sphingolipide in *lag1*Δ*dgt1*Δ schien es naheliegend, daß Lag1p und Dgt1p eine Rolle in der Übertragung der Phosphoinositolgruppe auf Ceramid in der IPCerS-Reaktion spielen. Eine geignete Methode zur Untersuchung der IPCerS-Aktivität ist die *in vivo*-Markierung von Zellen mit [^{3}H]-INO in der Gegenwart der membrangängigen Ceramidanaloga C2- und C6-Ceramid. Beide Strukturanaloga waren als potentielles Substrat für die IPCerS beschrieben (Levine *et al.*, 2000). Nach der Markierung wurden die

Gesamtlipidextrakte präpariert und mittels DC analysiert (Abb. 3.15; In Kooperation mit Béatrice Vallée und Howard Riezman, Biozentrum der Universität von Basel).

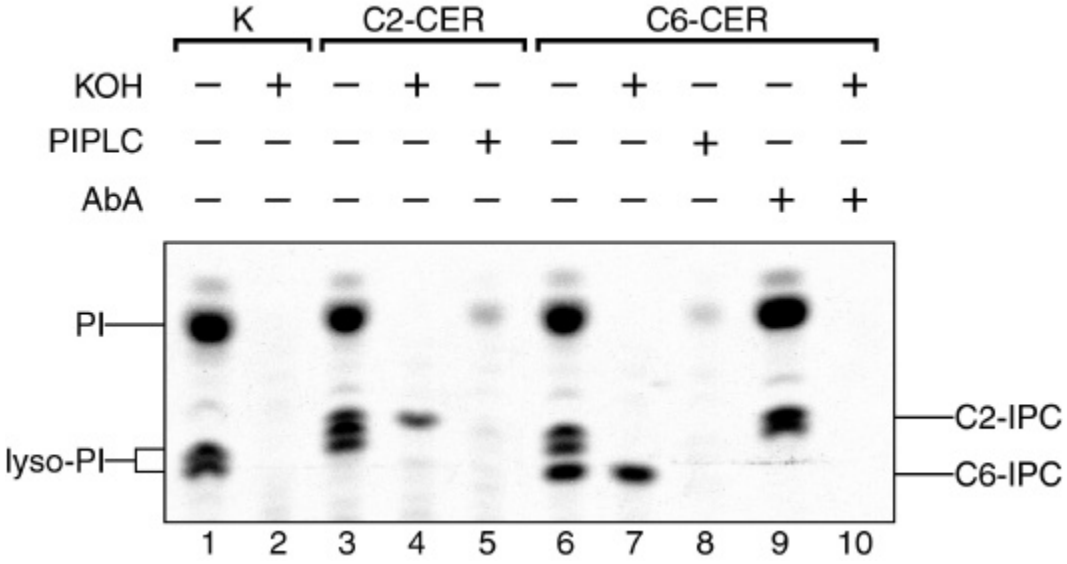


Abb. 3.15: IPCerS-Aktivität in *lag1*Δ*dgt1*Δ. 2×10^8 exponentiell wachsende *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen wurden geerntet, mit SC-INO gewaschen, in 0,5 ml SC-INO resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 25 µCi [^{3}H]-Inositol ohne weitere Zugaben (Spur1-2), in der Gegenwart von 40 µM Acetylceramid (Spur 3-5) oder Hexanoylceramid (Spur 6-10) für weitere 15 min inkubiert. Um Lipide als Produkte der IPCerS zu identifizieren, erfolgte die Markierung in der Gegenwart von 50 nM des IPCerS-Inhibitors AbA (Spur 9 und 10). Die Lipide wurden anschließend extrahiert, hydolysiert (Spur 2, 4, 7 und 10), mit PIPLC verdaut (Spur 5 und 8) und mittels DC (LMB) aufgetrennt.

Die Spuren 1 und 2 verdeutlichen noch einmal die drastisch verringerte Syntheserate inositolhaltiger Sphingolipide bei normaler Synthese von PI in der Mutante. Tatsächlich können unter den hier getesteten Bedingungen keine Sphingolipide identifiziert werden, da alle Banden sensitiv gegenüber alkalischer Hydrolyse sind. Durch die Zugabe von C2-Ceramid während der Markierung ergibt sich eine zusätzliche Bande im Fluorogramm, welche in der DC oberhalb von lyso-PI läuft (Spur 3). Diese Substanz ist resistent gegenüber alkalischer Hydrolyse und muß deshalb ein Ceramidgerüst besitzen (Spur 4). Das entsprechende Lipid wurde aber von der PIPLC komplett verdaut (Spur 5), was auf eine

terminale und einzelne Phosphoinositolgruppe schließen läßt. Dies identifiziert dieses Lipid als C2-IPC. C6-Ceramid verhielt sich unter diesen biosynthetischen Bedingungen bis auf das leicht hydrophobere Laufverhalten seiner Produkte in der DC identisch zu C2-Ceramid (Spur 6-8). Die ensprechende, zusätzliche Bande wurde demnach in Analogie zu C2-IPC C6-IPC benannt. Um sicher zu stellen, daß die Phosphoinosilierung von C6-Ceramid auf der IPCerS-Aktivität beruhte, wurden die Zellen kurz vor der Markierung mit dem potenten IPCerS-Inhibitor AbA (Nagiec *et al.*, 1997) inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird C6-IPC nicht gebildet (Spur 9 und 10). Dies bedeutete, daß C6-IPC und damit auch C2-IPC ein direktes Produkt der IPCerS sind und ihre Präsenz eine funktionelle IPCerS in *lag1*Δ*dgt1*Δ belegen. Der Synthesedefekt in *lag1*Δ*dgt1*Δ liegt deshalb offenbar nicht auf der Stufe der IPCerS, sondern in vorhergehenden Stufen des Biosyntheseweges. Diese Annahme wird dadurch verstärkt, daß Säugerzellen *LAG*-Homologe besitzen aber generell keine IPCers-Aktivität aufweisen.

3.2.4. Die Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* führt zu einer Akkumulation von Sphingoidbasen

Die bisherigen Daten zeigten eine defekte Sphingolipidbiosynthese in der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante auf. Als Folge davon besaßen die Zellen stark verringerte Mengen an Sphingolipiden und synthetisierten zudem unidentifizierte Lipide. Um ein genaueres Bild des Synthesedefekts sowie der Beschaffenheit der neuen Lipide zu erhalten, wurden Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen in der Gegenwart der radioaktiven Sphingolipidvorläufer [^{3}H]-INO, [^{3}H]-Palmitat ([^{3}H]-PA), [^{14}C]-Serin oder [^{3}H]-DHS über Nacht inkubiert, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und äquivalente Mengen mittels DC und Fluorographie analysiert (Abb. 3.16).

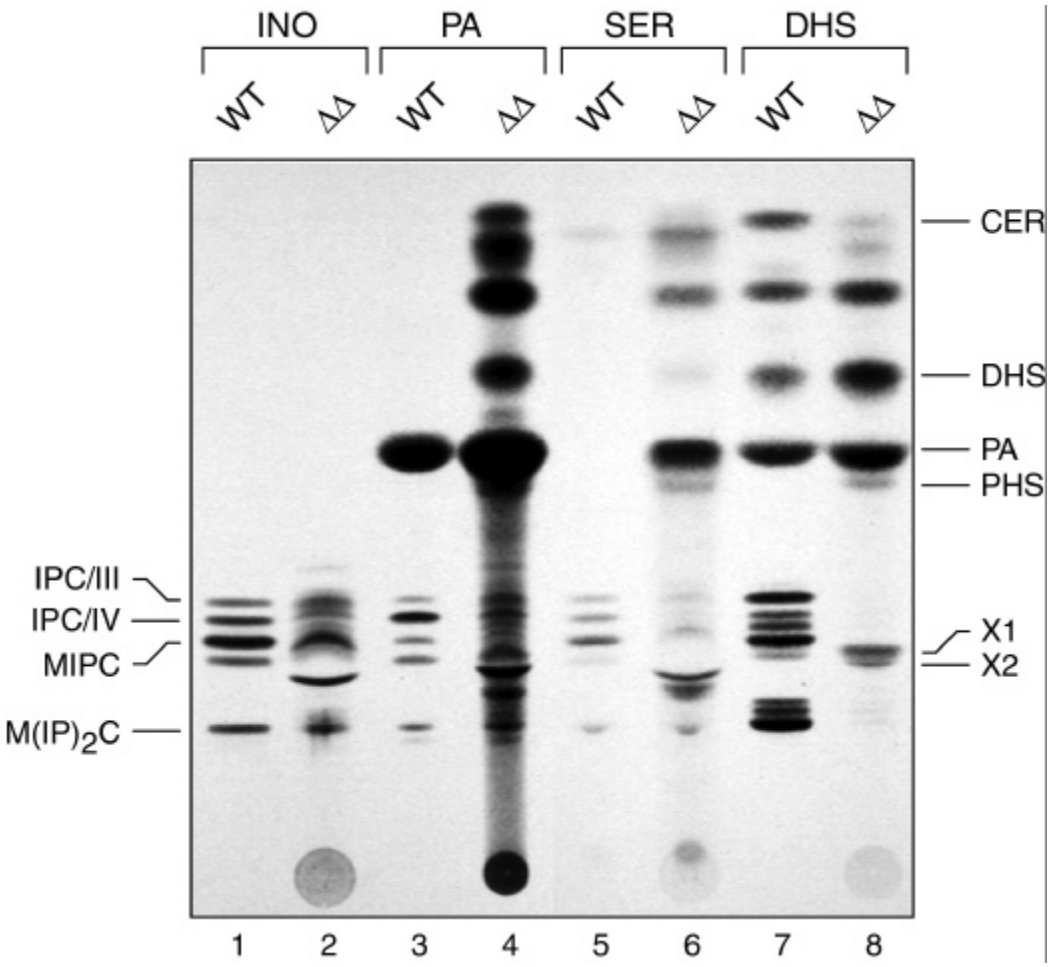


Abb. 3.16: Vergleich hydrolysierter und unterschiedlich markierter Lipidextrakte. Wildtyp (WT; Spur 1, 3, 5 und 7) und *lag1*Δ*dgt1*Δ (ΔΔ; Spur 2, 4, 6, 8) wurden über Nacht mit [^{3}H]-Inositol (INO; Spur 1 und 2), [^{3}H]-Palmitat (PA; Spur 3 und 4), [^{14}C]-Serin (SER; Spur 5 und 6) oder [^{3}H]-Dihydosphingosin (DHS; Spur 7 und 8) markiert und die Lipide extrahiert. Nach milder, alkalischer Hydrolyse und Entsalzung wurden äquivalente Mengen an Lipidextrakten auf HPTLC-Platten aufgetragen, in LMB aufgetrennt und mittels Fluorographie visualisiert. Zwei bisher unbeschriebene Lipide sind als X1 und X2 bezeichnet.

Wie zu erwarten sind die wesentlichen Sphingolipide IPC-III, IPC-IV, MIPC sowie $M(IP)_2C$ im Wildtyp vorhanden und inkorporierten allen Vorläufer (Spur 1, 3, 5 und 7). Abgesehen von den markierten Sonden selbst zeigen die [^{3}H]-PA- und [^{14}C]-Serinmarkierungen keine weiteren, identifizierbaren Banden (Spur 3 und 5), wohingegen [^{3}H]-DHS zu PA metabolisiert wurde und außerdem in Ceramid zu finden ist (Spur 7). Die Quantifizierung zeigt, daß die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante $M(IP)_2C$ in annähernd gleichen Mengen synthetisierte wie Wildtyp, aber deutlich weniger IPC und MIPC besitzt (Spur 2, 4 und 6). Im Gegensatz dazu sind die Sphingoidbasen DHS und PHS in der Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* in weitaus höheren Mengen als im Wildtyp vorhanden. Die prominente Bande, welche generell oberhalb von DHS zu finden war, konnte aufgrund eines fehlenden Standards nicht eindeutig zugeordnet werden, entspricht aber in ihrem relativen Laufverhalten und dem Markierungsmuster dem direkten Kondensationsprodukt von Serin und Palmitat, Keto-DHS (Beeler *et al.*, 1998). Interessanterweise sind in der Mutante zwei weitere, unidentifizierte Lipide X1 und X2 vorhanden, welche Inositol, PA, Serin, DHS und Phosphat enthalten, aber nicht von Mannose markiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Markierung der Zellen mit [^{3}H]-DHS offenbarte einen weiteren Defekt in der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante (Spur 7 und 8). Obwohl zumindest das Hauptsphingolipid $M(IP)_2C$ in durchaus detektierbaren Mengen vorhanden sein mußte, wurde exogenes [^{3}H]-DHS im Gegensatz zu endogen synthetisiertem DHS nicht in Sphingolipide oder Ceramid inkorporiert. Dies schien umso verwunderlicher, als exogenes DHS in der Doppelmutante sowohl zu Palmitat als auch zu PHS metabolisiert wurde.

3.2.5. Lag1p und Dgt1p sind essentiell für den Einbau von exogenen Dihydrosphingosin in Ceramid *in vivo*

Es war bekannt, daß exogenes DHS nach der Aufnahme erst phosphoryliert und anschließend wieder dephosphoryliert werden muß, um als Substrat in die CerS-Reaktion eingehen zu können (Mao *et al.*, 1997; Qie *et al.*, 1997; Nagiec *et al.*, 1998). Da der Einbau von exogenem [^{3}H]-DHS in Ceramid in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* nahezu komplett inhibiert ist, sollte die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Sphingoidbasen in *lag1*Δ*dgt1*Δ näher untersucht werden. Sphingoidbasen akkumulieren in dieser Mutanteund so war es denkbar, daß eine weitere Aufnahme von DHS reprimiert war. Um einen derartigen Effekt in Form einer Negativkontrolle zu umgehen, wurden die Zellen vor der [^{3}H]-DHS-Markierung für zwei Stunden mit dem SPT-Inhibitor Myriocin und/oder dem CerS-Inhibitor FB1 inkubiert. Dies sollte eine drastische Reduktion des internen Sphingoidbasen- und eines möglichen Ceramidniveaus erlauben. Darüberhinaus sollte auf diese Art und Weise Ceramid eindeutig identifizierbar sein. Nach der folgenden, halbstündigen Markierung wurden die Zellen schließlich geerntet, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und nach Entsalzung mittels DC und Fluorographie analysiert (Abb. 3.17). In der Abwesenheit beider Toxine inkorporierten Wildtypzellen exogenes [^{3}H]-DHS in Ceramid, inositolhaltige Sphingolipide und auch DHS-1-P, wobei der Hauptanteil der Radioaktivität aufgrund der kurzen Markierungsdauer in Ceramid und IPC-III zu finden ist (Spur 1). Das terminale Sphingolipid $M(IP)_2C$ kann kaum detektiert werden. Die Präinkubation mit FB1 führt in Wildtypzellen erwartungsgemäß zu stark reduzierten Signalen von Ceramid und in Folge auch inositolhaltiger Sphingolipide (Spur 2).

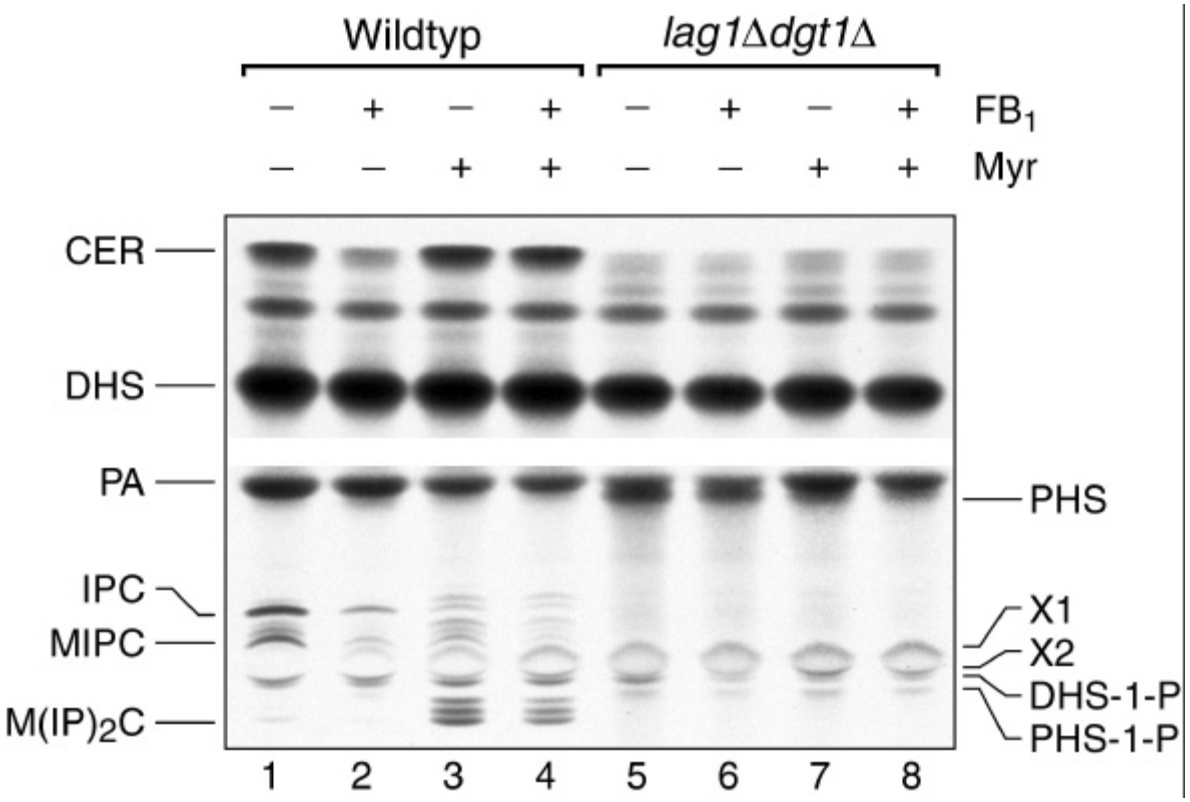


Abb. 3.17: Inkorporation von exogenem [^{3}H]-DHS in Ceramid ist defekt in *lag1*D*dgt1*D. Wildtyp (Spur 1-4) und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen (Spur 5-8) wurden in der exponentiellen Phase geerntet und mit frischem SC-Medium auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen pro ml eingestellt. 1 ml Kulturen wurden in der Gegenwart von 100 µM FB1 (Spur 2, 4, 6 und 8) und/oder 20 µg Myriocin (Myr; Spur 3, 4, 7 und 8) für 120 min bei 30 °C präinkubiert und anschließend mit 2 µCi [^{3}H]-DHS für weitere 30 min markiert. Die Zellen wurden geerntet, die Lipide extrahiert, hydrolysiert, entsalzen und in 100 µl CMW resuspendiert. Je 5 µl wurden mittels DC (LMB) aufgetrennt und Fluorographie visualisiert. Beide Teile des Fluorogramms entstammen demselben Dünnschichtchromatogramm, wurden aber unterschiedlich lang exponiert.

Das Signal entsprechend zu DHS-1-P bleibt unter diesen Umständen nahezu unverändert, wohingegen PHS, geringe Mengen an PHS-1-P und die unidentifizierten Lipide X1 und X2 akkumulieren. Die Behandlung von Wildtypzellen mit Myriocin bewirkt einen deutlich verstärkten Einbau von exogenem [^{3}H]-DHS in Ceramid und Sphingolipide (Spur 3), eine Beobachtung, die ein Aushungern der Zellen an endogenen Sphingoidbasen aufgrund einer effizienten Inhibition der SPT verdeutlicht. Interessanterweise werden die neuen Lipide X1 und X2 unter diesen Bedingungen auch in Wildtypextrakten sichtbar, was zeigt, daß ihre Synthese nicht auf die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Deletion zurückzuführen ist. Die Anwesenheit beider

Toxine während der Präinkubation führt zu einer ähnlich starken Inkorporation von [^{3}H]-DHS in Ceramid und Sphingolipide wie in dem Experiment mit Myriocin allein (Spur 4). Dies beweist, daß unter diesen Umständen einerseits die IPT effizient und andererseits die CerS nicht komplett inhibiert wird. Im Gegensatz zum Wildtyp metabolisiert *lag1*Δ*dgt1*Δ exogenes [^{3}H]-DHS nicht zu Ceramid oder höheren Sphingolipiden, wohl aber zu PHS, DHS-1-P, PHS-1-P und X1/X2 (Spur 5). Tatsächlich beeinflußt weder die Anwesenheit von FB1 oder die von Myriocin das Markierungsmuster der Doppeldeletionszellen (Spur 6-7). Diese interessante Beobachtung erlaubt eine Reihe von Aussagen. Zum Einen scheint eine Kompetition von endogenen und exogenen Sphingoidbasen in *lag1*Δ*dgt1*Δ den Inkorporationsdefekt von [^{3}H]-DHS in Ceramid nicht zu begründen. Falls der generelle Defekt in der Sphingolipidbiosynthese nach der CerS-Reaktion gewesen wäre, hätte sich vermutlich auch Ceramid in der Zelle angehäuft und eine weitere Inkorporation von [^{3}H]-DHS repremiert. Auch diese Hypothese kann verworfen werden, da die zweistündige Inhibition der CerS mittels FB1 die internen Ceramidmengen hätte verringern müssen. Somit sollte der Einbau von [^{3}H]-DHS in der Doppelmutante zumindest nach der Präinkubation mit beiden Inhibitoren erleichtert gewesen sein. Die Phosphorylierungsrate von Sphingoidbasen in *lag1*Δ*dgt1*Δ scheinnt ebenfalls nicht beinträchtigt zu sein, da die Mutante DHS-1-P in Wildtypmengen besitzt und sogar PHS-1-P akkumuliert. Eine unveränderte Phosphorylierungsrate in *lag1*Δ*dgt1*Δ wird zudem durch die Beobachtung bestärkt, daß die Konvertierung von (PHS-1-P)DHS-1-P zu (2-Hydroxy-)Palmitaldehyd und in Folge zu Glycerolipiden mit derselben Effizienz wie im Wildtyp geschieht (Abb. 3.18). Mao *et al.* (1997) zeigten, daß die Abwesenheit der Sphingoidbasenphosphat-Phosphatase Lcb3p die Konvertierung von exogenem [^{3}H]-DHS zu PHS generell verhindert. Die Anwesenheit von PHS schließt eine ähnliche Situation in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen aus.

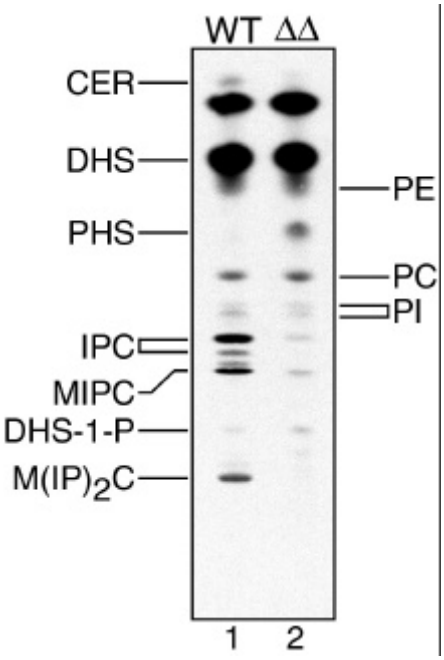


Abb. 3.18: Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Sphingoidbasen ist unbeeinträchtigt in *lag1*D*dgt1*D. Wildtyp (Spur 1) und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen (Spur 2) wurden in der exponentiellen Phase geerntet, mit frischem SC-Medium auf eine Zelldichte von $0{,}5\times10^7$ Zellen pro ml eingestellt und je 1 ml Kultur mit 3 µCi [^{3}H]-DHS für 180 min markiert. Die Zellen wurden geerntet, die Lipide extrahiert und in 100 µl CMW resuspendiert. Je 5 µl wurden mittels DC (LMB) aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert.

Die hier gewonnenen Daten legitimieren deshalb die Behauptung, daß Lag1p und Dgt1p in der Biosynthesesequenz nach Lcb3p ein essentieller Bestandteil in der Metabolisierung von exogenem DHS zu Ceramid sind.

3.2.6. *lag1*D*dgt1*D-Zellen sind resistent gegenüber Fumonisin B1

Das Langzeitmarkierungsmuster von *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen mit [^{3}H]-PA weist nach alkalischer Hydrolyse einige zusätzliche Banden mit einem ceramidähnlichen Laufverhalten auf (Abb. 3.16). Um zu klären, ob die entsprechenden Lipide Produkte der CerS sind, wurde ihre Sensitivität gegenüber FB1 getestet.

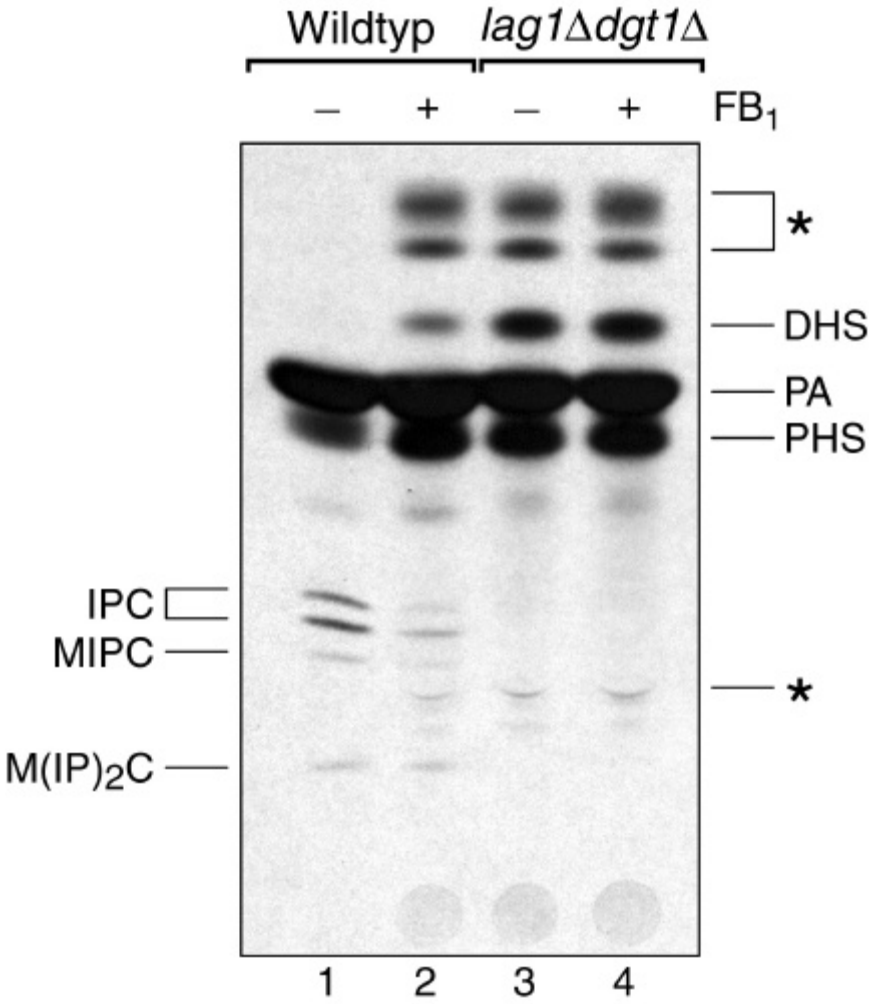


Abb. 3.19: Lipidsynthese in *lag1*D*dgt1*D ist resistent gegenüber FB1. Wildtyp- (Spur 1 und 2) und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen (Spur 3 und 4) wurden in der exponentiellen Phase geerntet und mit frischem SC-Medium auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen pro ml eingestellt. 1 ml Kulturen wurden in der Gegenwart von 100 µM FB1 (Spur 2 und 4) für 120 min bei 30 °C präinkubiert und anschließend mit 5 µCi [^{3}H]-PA für weitere 60 min markiert. Die Zellen wurden geerntet, die Lipide extrahiert, hydrolysiert, entsalzen und in 100 µl CMW resuspendiert. Je 5 µl wurden mittels DC (LMB) aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert. Die Banden, welche mit einem Stern markiert sind, entsprechen unidentifizierten, alkalistabilen Lipiden.

Nach Präinkubation mit dem CerS-Inhibitor wurden die Zellen für kurze Zeit mit [^{3}H]-PA markiert und die Lipide nach Extraktion und Hydrolyse mittels DC analysiert (Abb. 3.19). Unbehandelte Wildtypzellen inkorporierten [^{3}H]-PA unter diesen Bedingungen in PHS, IPC-III, IPC-IV, MIPC und M(IP)$_2$C (Spur 1). Eine zusätzliche Bande, die etwas unterhalb von

PHS lief, kann mangels eines geeigneten Standards nicht identifiziert werden. Ceramid wird hingegen nicht detektiert, eine Tatsache, welche für die kurze Halbwertszeit eines Botenstoffs spricht. Die Behandlung der Zellen mit dem CerS-Inhibitor FB1 reduziert die Synthese komplexer Sphingolipide, wobei IPC davon am stärksten betroffen ist (Spur 2). Im Gegensatz dazu akkumulieren neben PHS und DHS auch eine Reihe unidentifizierter Lipide (mit einem Stern markiert). Es stellte sich heraus, daß *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen bis auf kaum detektierbare Mengen an Sphingolipiden exakt dasselbe Markierungsmuster aufweisen wie FB1-behandelte Wildtypzellen (Spur 2 und 3). Darüberhinaus hat FB1 unter diesen Bedingungen keinerlei Einfluß auf die Lipidzusammensetzung der Doppelmutante, da sich die entsprechenden Extrakte in ihrem Muster völlig decken (Spur 3 und 4). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß die akkumulierten Lipide in der Mutante keine Produkte der CerS sind, sondern die Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* vielmehr einen Block in der CerS-Reaktion verursacht.

3.2.7. Die Fettsäureelongation ist nicht reduziert in *lag1*D*dgt1*D

Die CerS benötigt als Substrate DHS/PHS und C24-CoA/C26-CoA. Die sehr langen Fettsäuren entstehen durch Elongation von C20 zu C24 und C26 unter Katalyse des membranassoziierten Elongationskomplexes Elo2p/Elo3p (Oh *et al.*, 1997). Die Deletion von *ELO2* und *ELO3* ist synthetisch letal, die Deletion eines der Gene reduziert indes die Synthese von Ceramid und führt zu einer Akkumulation von Sphingoidbasen. Da die Doppeldeletion von *LAG1* und *DGT1* einen ähnlichen Phänotyp aufweist, war ein Defekt in der Fettsäureelongation nicht auszuschliessen. Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen wurden organische Zellextrakte unter saurer Methanolyse präpariert und mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie

sowie der Verwendung authentischer Standards analysiert (Abb. 3.20).

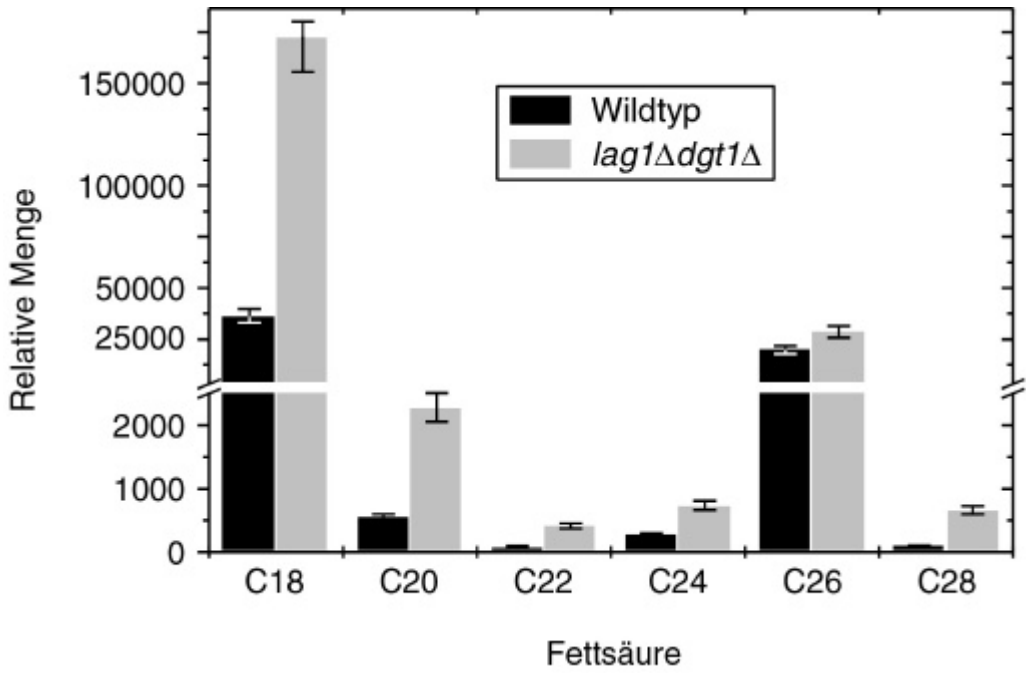


Abb. 3.20: Analyse methylierter Fettsäuren nach saurer Methanolyse kompletter Zellen. Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet und das Zellpellet für 20 h in salzsaurem Methanol gekocht. Der Überstand wurde mit Hexan/Diethylether extrahiert und der Extrakt mit den methylierten Fettsäuren getrocknet. Die Analyse der Fettsäuren erfolgte mittels GC/MS. Es ist zu beachten, daß sich die Skalierung des Diagramms oberhalb und unterhalb des Umbruchs unterscheidet.

Als Referenzwert dient die endogene Palmitatmenge, welche im Wildtyp und in der Mutante auf 100 % festgelegt wurde. Es zeigte sich, daß die Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* das Niveau aller gesättigten Fettsäuren nicht negativ beeinflußt. Vielmehr scheint die Mutante vergleichsweise erhöhte Mengen langkettiger Fettsäuren zu besitzen. Ein *lag1*Δ*dgt1*Δ-begründeter Defekt im Elongationprozeß zu C26-Fettsäuren, dem Substrat für die CerS-Reaktion, kann anhand dieser Analyse ausgeschlossen werden.

3.2.8. Überexpression von *LAG1* und *DGT1* beeinflußt nicht die Ceramidsynthese *in vivo*

Die Zusammenfassung aller bisherigen Daten über den Synthesedefekt in *lag1*Δ*dgt1*Δ deutet auf einen Block der CerS hin. Da dieser Reaktion bis dato als einziger in der Sphingolipidbiosynthese kein Gen oder Protein zugeordnet werden konnte (siehe Einleitung) ist es möglich, daß *LAG1* und *DGT1* für die katalytischen Einheiten der CerS kodieren. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden beide Gene im Wildtyp überexpremiert und eine eventuelle Überproduktion von Ceramid und Sphingolipiden untersucht. Zu diesem Zweck fand das in Kapitel 3.1.5 beschriebene Plasmid pSTS30 Verwendung, da es die synchrone Expression von *LAG1* und *DGT1* unter der Kontrolle des glukoserepremierten *GAL1/10*-Promotors erlaubt. Um möglichen Unregelmäßigkeiten beim Diauxiesprung von Glukose auf Galaktose während der Expressionsinduktion vorzugreifen, wurden die Zellen bereits im Vorkulturstadium unter induzierenden Bedingungen angezogen. Es stellte sich dabei heraus, daß die durch Western Blot kontrollierte Überexpression von *LAG1* und *DGT1* unter diesen Bedingungen keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zur Negativkontrolle erzeugt (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurden die Überexpressions- und die Kontrollzellen auf eine identische Zelldichte eingestellt, für zwei Stunden mit [^{3}H]-DHS markiert und die Lipidextrakte analysiert (Abb. 3.21). Unter den hier getesteten Bedingungen weisen die Gesamtlipidextrakte aus der Überexpressions- und der Kontrollkultur keinerlei Unterschiede auf. Beide Stämme inkorporierten exogenes [^{3}H]-DHS zu gleichen Teilen in Ceramid, inositolhaltige Sphingolipide und Glycerolipide.

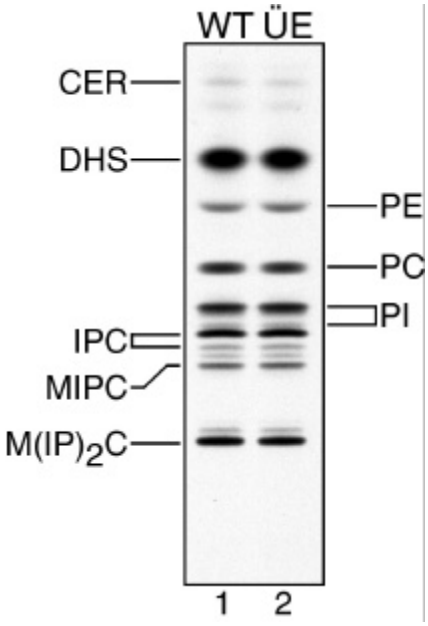


Abb. 3.21: Auswirkung der Überexpression von *LAG1* und *DGT1* auf die Lipidbiosynthese. Wildtyp mit dem Kontrollplasmid pESC (Spur 1) und dem Überexpressionsplasmid pSTS30 (Spur 2) wurden in SG-Ura über Nacht angezogen, steril geerntet und mit frischem SG-Ura auf eine Zelldichte von $0{,}5\times10^7$ Zellen pro ml eingestellt. Je 1 ml Kultur wurden anschließend mit 3 µCi [^{3}H]-DHS für 120 min markiert. Die Zellen wurden geerntet, die Lipide extrahiert und in 100 µl CMW resuspendiert. Je 5 µl wurden mittels DC (LMB) aufgetrennt und Fluorographie visualisiert.

Eine Überlegung in diesem Zusammenhang war, daß die vorhandenen Ceramidasen durch ihre lytische Aktivität die Menge an Ceramid in der Zelle kontrollieren und dadurch eine Überproduktion dieses Sekundärbotenstoffs inhibieren. Um eine derartige Degradation auszuschließen, wurde die Überexpression von *LAG1* und *DGT1* sowie die Kontrolle in einem ceramidasedefizienten genetischen Hintergrund durchgeführt. Zur Identifikation einer möglichen Überproduktion von Ceramid oder Sphingolipiden wurde die Zellen zum einen, wie oben beschrieben, mit [^{3}H]-DHS markiert, oder zu anderen in der Gegenwart von [^{32}P]-P über Nacht bis zur spätexponentiellen Phase angezogen. Die Ergebnisse der mittels DC und Phosphoimager analysierten Lipide brachten allerdings insofern keine neuen Erkenntnisse, als sich die relativen Mengen von Sphingolipiden oder Ceramid in der Überexpressionkulter von

denen der Kontrollkultur nicht untescheiden (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression von *LAG1* und *DGT1 in vivo* scheint also keinen Einfluß auf die Ceramidproduktion zu haben, eine Tatsache, die eine katalytische Aktivität von Lag1p und Dgt1p in der CerS-Reaktion in Frage stellen.

3.2.9. Lag1p und Dgt1p sind ein essentieller Bestandteil der CerS-Reaktion *in vitro*

Die Analysen im vorhergehenden Kapitel werfen Zweifel bzgl. einer möglichen katalytischen Aktivität von Lag1p und Dgt1p auf. Es muß in diesem Zusammenhang allerdings bedacht werden, daß Ceramid im Licht seiner fatalen Signalwirkung in der Zelle höchstwarscheinlich unter strenger Kontrolle synthetisiert wird. Aus dieser Annahme heraus erwuchs die Idee, die Ceramidsynthese in Abhängigkeit von *LAG1* und *DGT1* außerhalb ihres nativen Umfelds zu prüfen. Hierfür wurde in Kooperation mit Béatrice Vallée und Howard Riezman ein neu entwickeltes *in vitro*-System verwendet, welches sich von dem bisher publizierten in einigen wesentlichen Merkmalen unterscheidet. So war es bisher üblich, grob präparierte mikrosomale Membranen direkt mit Stearoyl-CoA und [^{3}H]-DHS ohne weitere Zugaben zu inkubieren. Dieses für die Säuger-CerS entwickelte System fand wissentlich bisher nur einmal mit Hefemembranen Anwendung (Wu *et al.*, 1995). In der vorliegenden Dissertation konnte in einer Reihe von Ansätzen die von Wu und Mitarbeitern gemessenene CerS-Aktivität nicht reproduziert werden. Tatsächlich war unter diesen Bedingungen keinerlei neu synthetisiertes Ceramid detektierbar (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die hohe Spezifität der Hefe-CerS für C24- und C26-Fettsäuren, zwei Substrate, welche nicht verfügbar waren. Darüberhinaus wurde kürzlich entdeckt, daß die CerS-

Reaktion in Hefe von der Anwesenheit eines cytosolischen Faktors, anders als die löslichen Sphingoidbasekinasen, abhängig ist (Howard Riezman, pers. Mitteilung). Das hier verwendete *in vitro*-System setzt sich aus gewaschenen und angereicherten ER-Membranen, Cytosol, einem ATP-regenerierenden System und [^{3}H]-DHS zusammen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von freiem CoA und einem liposomalen Gemisch aus Hexacosaninsäure und PI gestartet. Nach der Inkubation wurden die Lipide extrahiert, hydrolysiert und nach Entsalzung mittels DC und Fluorographie analysiert (Abb. 3.22).

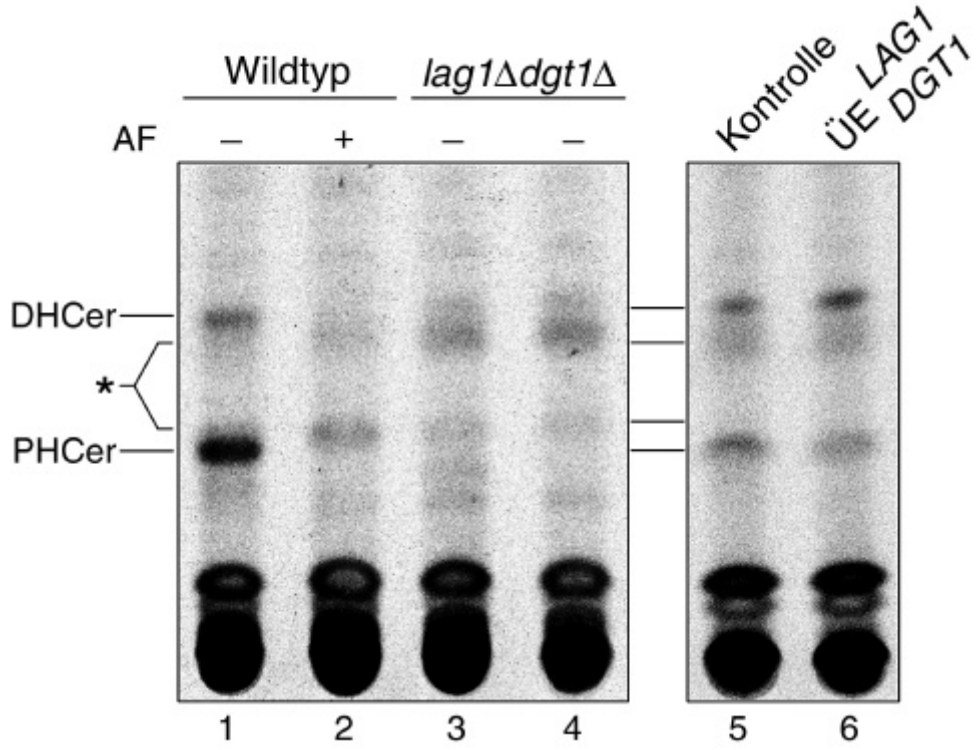


Abb. 3.22: Lag1p und Dgt1p sind ein essentieller Bestandteil für die CerS-Reaktion *in vitro*. Membranen von Wildtyp (Spur 1und 2), *lag1Δdgt1Δ* (Spur 3 und 4), Wildtyp mit dem Kontrollplasmid pESC (Kontrolle; Spur 5) oder dem Überexpressionsplasmid pSTS30 (ÜE *LAG1 DGT1*; Spur6) wurden präpariert. Diese mikrosomalen Membranen wurden anschließend mit Cytosol, einem ATP-regenerierenden System, GDP-Mannose, und [^{3}H]-DHS für 15 min bei 24 °C in der Gegenwart von Australifungin (Spur 2) vorinkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von CoA und einem liposomalen Gemisch aus Hexacosaninsäre und PI. Nach weiteren 120 min Inkubation wurde die Reaktion mit Chloroform/Methanol (1/1 [v/v]) gestoppt, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und mittels DC (LMC) aufgetrennt. Unidentifizierte Banden sind mit einem Stern markiert.

Unter diesen Bedingungen synthetisieren Wildtypmembranen typischerweise sowohl DHCer als auch PHCer. Diese beiden Formen von Ceramid können mit Hilfe des hier verwendeten sauren Laufmittels gut voneinander getrennt werden. Der relative Anteil von DHCer und PHCer an der Gesamtmenge des gebildeten Ceramids ist abhängig von der Membranpräparation und deshalb variabel. Die Mengen komplexer Sphingolipide, welche während der Reaktion formiert wurden, sind sehr gering (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung schafft die Voraussetzung für eine direkte Korrelation des detektierten Ceramids mit der CerS-Aktivität. Wenn der Versuch in der Gegenwart des potenten CerS-Inhibitors Australifungin durchgeführt wurde, kann kein Ceramid detektiert werden. Unidentifizierte Banden (mit einem Stern markiert) bleiben dagegen unter dieser Bedingung unverändert oder nehmen in ihrer Intensität zu, eine Tatsache, welche eine Zuordnung der ensprechenden Lipide als Produkte der CerS ausschließt. In Übereinstimmung mit den *in vivo*-Versuchen liegt die Menge an in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Membranen gebildeten Ceramid unterhalb der Detektionsgrenze.

Im nächsten Schritt sollten Membranen, welche aus *LAG1* und *DGT1* überexpremierenden Zellen stammten, auf eine mögliche Erhöhung der CerS-Aktivität hin untersucht werden. Als Kontrolle dienten Membranen aus Zellen mit dem leeren Kontrollplasmid. Aus der Analyse der Chromatogramme ist ersichtlich, daß sich die Gesamtmenge von Ceramid in den beiden Ansätzen nicht unterscheidet, obwohl Membranen aus dem Überexpressionsstamm vergleichsweise mehr DHCer aber weniger PHCer als die Kontrollmembranen synthetisierten (Spur 4-6). Wie aber bereits erwähnt wurde, ist diese schwankende Verteilung auch zwischen verschiedenen Wildtypmembranfraktionen unterschiedlicher Präparationen präsent, was die Überexpression von *LAG1* und *DGT1* als Ursache für diesen Effekt tendenziell ausschließt.

3.3. Die Funktion von Ypc1p und Ydc1p als Suppressoren der *lag1*D*dgt1*D-Doppeldeletion

Am Anfang der Analysen von Lag1p und Dgt1p stand der Versuch, die Funktion beider Proteine durch ein Auffinden möglicherweise bekannter Suppressoren zu bestimmen. In diesem Sinne isolierte Wolfgang Barz das bis dato uncharakterisierte Gen YBR183w (*YPC1*). Überexpremiert vermag es, den Wachstumsdefekt der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante zu 80 % zu revertieren (Abb. 3.23). *YPC1* kodiert für ein Membranprotein mit höchstwarscheinlich sechs TMD (Kyte und Doolittle, 1982; von Heijne, 1992; Hofmann und Stoffel, 1993; Persson und Argos, 1994) und einem C-terminalen Dilysinmotiv, charakteristisch für ER-residente Proteine oder solche, die zyklisch zwischen ER und Golgi transportiert werden (siehe Kap. 3.1.3).

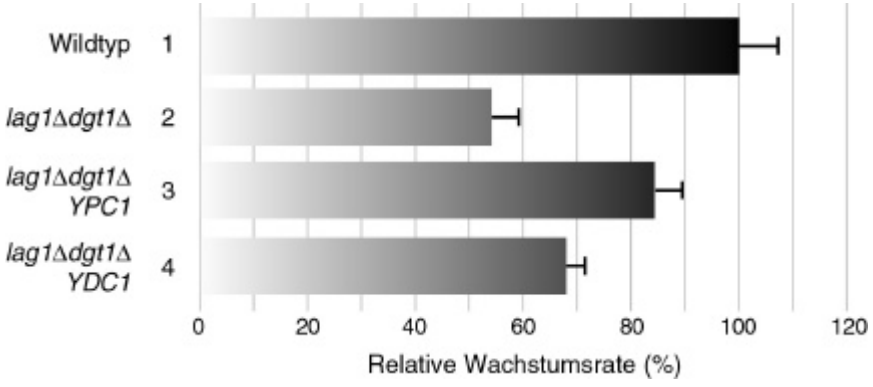


Abb. 3.23: Überexpression von YBR183w (*YPC1*) und YPL087w (*YDC1*) supprimiert den *lag1*D*dgt1*D-Wachstumsdefekt partiell. YBR183w (Reihe 3) und YPL087w (Reihe 4) wurden mit ihren flankierenden, nichtkodierenden Sequenzen in den Hochkopienvektor pRS425 (Christianson *et al.*, 1992) kloniert und in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen transformiert. Die Wachstumsraten der überexpremierenden Zellen wurden im Vergleich zum Wildtyp (Reihe 1) und *lag1*Δ*dgt1*Δ (Reihe 2) bei 30 °C in SC-Medium analysiert. Die Wachstumsrate des Wildtyps wurde auf 100 % normiert.

Andere Sequenzmotive, welche einen Hinweis auf die Funktion des *YPC1*-kodierten Proteins hätten geben können, wurden nicht identifiziert. Auch weist die Komplettsequenz keine signifikante Ähnlichkeit zu Lag1p und Dgt1p auf, ist aber zu ca. 70 % zu einem weiteren uncharakterisierten Gen YPL087w (*YDC1*) identisch. Obwohl *YDC1* über den Weg der Suppressoranalyse nicht isoliert wurde, führt dessen gezielte Klonierung und Überexpression zu einer Revertierung des *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekts zu ca. 68 % der Wildtypwachstumsrate (Abb. 3.23).

3.3.1. Überexpression von *YPC1* und *YDC1* erhöht die Synthese komplexer Sphingolipide in *lag1*Δ*dgt1*Δ

Da eine Überexpression der Gene *YPC1* und *YDC1* eine partielle Suppression des Wachstumsdefekts der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Mutante erlaubt, sollte eine mögliche Beteiligung der kodierten Proteine in der Sphingolipidsynthese untersucht werden. Zur Bestimmung der Biosynthese komplexer Sphingolipide wurden die supprimierten Zellen mit [^{3}H]-Inositol pulsmakiert und für den angegebenen Zeitraum mit einem Überschuß an kaltem Inositol weiter inkubiert. Die extrahierten Lipide wurden anschließend mittels DC aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert (Abb. 3.24). Der Vergleich der Spuren 1 und 2 in Abb. 3.24 verdeutlicht ein weiteres Mal den Lipiddefekt der Doppelmutante. Die Überexpression von *YPC1* in *lag1*Δ*dgt1*Δ führt interessanterweise zu einer partiellen Revertierung des Synthesedefekts, insbesondere der Synthese von M(IP)$_2$C. Auch die Bildungsraten von PI/B und IPC/C nehmen zu, allerdings erreichen sie nicht die Wildtypniveau. Im Gegensatz dazu scheint die Menge gebildeten Lyso-PI/FG sowie unidentifizierter Lipide im Vergleich zu der nicht supprimierten Mutante zurückzugehen.

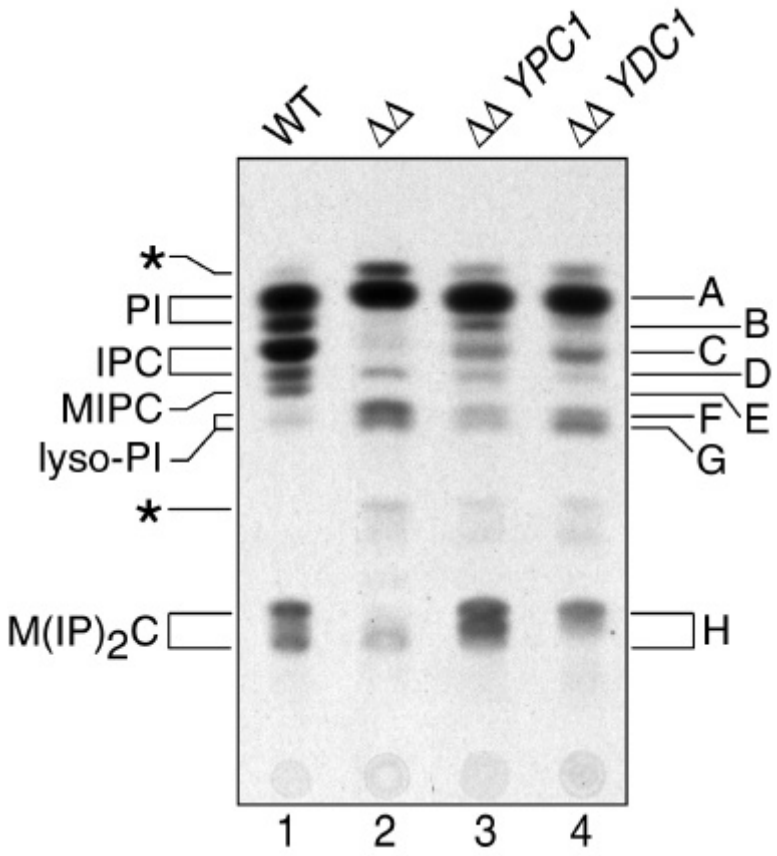


Abb. 3.24: Synthese inositolhaltiger Lipide in supprimierten *lag1*D*dgt1*D-Zellen. Wildtyp (WT; Spur 1), *lag1*Δ*dgt1*Δ (ΔΔ; Spur2), *lag1*Δ*dgt1*Δ mit Überexpression von *YPC1* (ΔΔ *YPC1*; Spur 3) oder *YDC1* (ΔΔ *YDC1*; Spur 4) wurden in der exponentiellen Phase geerntet, 3 OD_{600}ml in 600 µl SC-Medium ohne Inositol resuspendiert und 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µCi [^{3}H]-Inositol für 20 min markiert und nach Zugabe von 620 µl YPD inkl. 80 µg/ml Inositol für weitere 60 min inkubiert. Gesamtlipidextrakte wurden entsprechend der Anleitung im Kapitel 5.5.2 präpariert, mittels DC (LMA) aufgetrennt und mit Hilfe von Fluorographie visualiert. Die Identifikation der Lipide erfolgte mittels authentischer Standards. Nicht identifizierte Lipide sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine ähnliche Beobachtung ergibt sich im Fall der *YDC1*-Suppression. Auch hier kann der Sphingolipiddefekt zugunsten des Wildtypphänotyps partiell gerettet werden, wenngleich in einem geringeren Maße als in *YPC1*-supprimierten Deletionszellen. Interessanterweise korrelieren die relativen Werte der Revertierung des Wachstumsdefektes mit denen der Revertierung des Lipiddefektes in den beiden supprimierten Mutanten mit leichten Vorteilen

von *YPC1* gegenüber *YDC1*. Im Zusammenhang mit der hohen Sequenzidentität sind die Funktionen der kodierten Proteine offenbar ähnlich aber nicht identisch.

3.3.2. *YPC1*- und *YDC1*-supprimierte *lag1*D*dgt1*D-Zellen besitzen erhöhte Mengen komplexer Sphingolipide

Um ein Bild der Gesamtmengen komplexer Sphingolipide in den supprimierten Mutanten zu erhalten, wurden die Zellen mit [^{32}P]-P inkubiert, die extrahierten und hydrolysierten Lipide über DC aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert (Abb. 3.25). Die Überexpression von *YPC1* und *YDC1* erhöht die Level von M(IP)$_2$C mindestens auf Wildtypniveau, während die Mengen an IPC die der Doppelmutante nicht oder nur kaum übersteigen. Die Lipidzusammensetzung der *YPC1*-supprimierten Mutante entspricht qualitativ der der nicht supprimierten Mutante. In *YDC1*-supprimierten Zellen hingegen wird fast ausschließlich M(IP)$_2$C identifiziert, welches in seinem Laufverhalten dem einer wenig hydroxylierten Form entspricht und demnach vermutlich auf DHCer basiert. Erstaunlicherweise synthetisieren diesselben Zellen im Vergleich zum Wildtyp oder der Mutante hohe Mengen an IPC-IV. Puoti *et al.* (1991) spekulierten aufgrund ihrer Sphingolipidanalysen, daß IPC-IV in einem nur sehr begrenztem Maß in den weiteren Biosyntheseweg eingehe und deshalb als ein Endprodukt anzusehen sei. Eine Klärung dieses Phänomens ist an dieser Stelle nicht möglich.

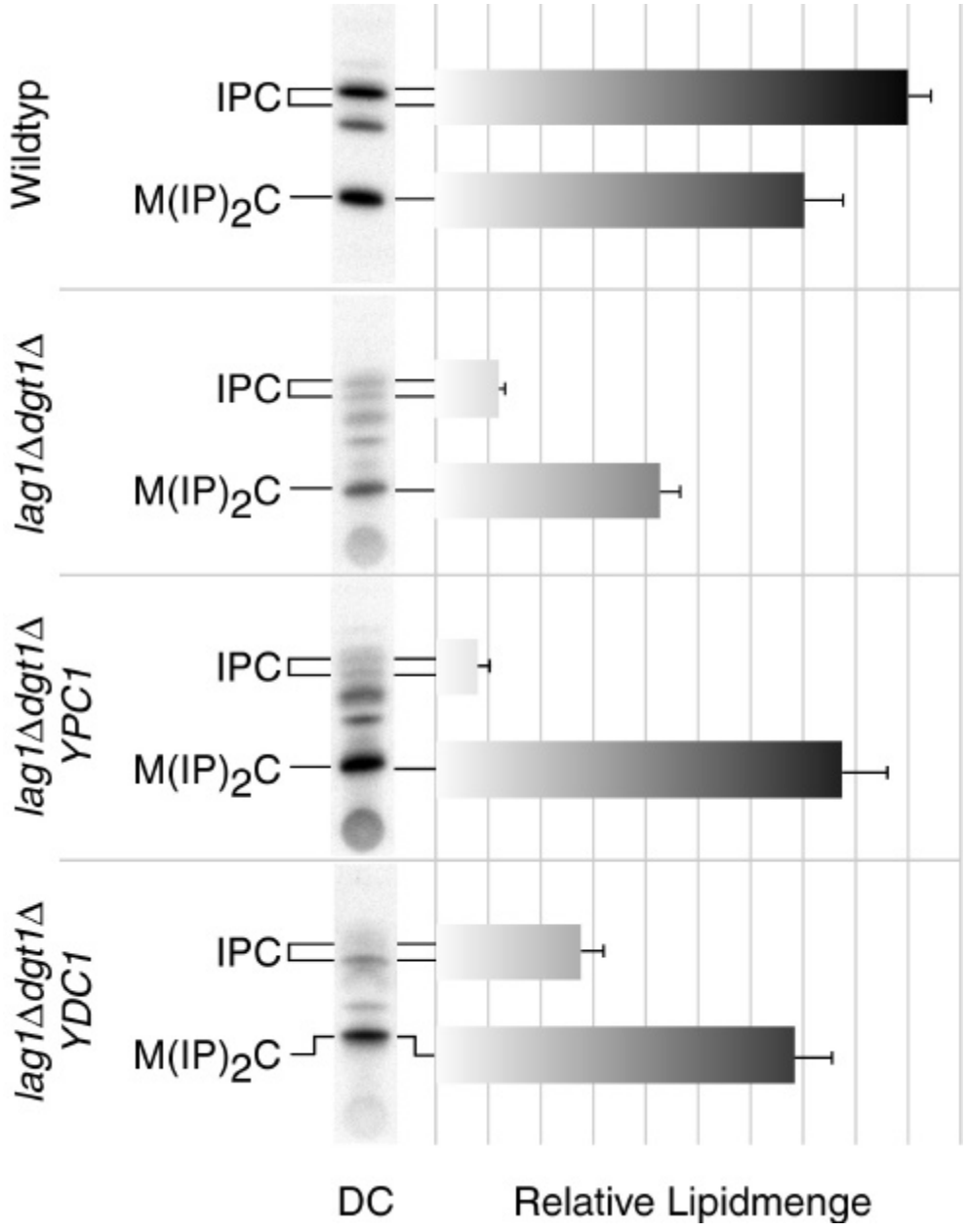


Abb. 3.25: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in supprimierten *lag1*D*dgt1*D-Zellen. Wildtyp, *lag1*Δ*dgt1*Δ, *lag1*Δ*dgt1*Δ mit Überexpression von *YPC1* (*lag1*Δ*dgt1*Δ *YPC1*) oder *YDC1* (*lag1*Δ*dgt1*Δ *YDC1*) wurden über Nacht in 1 ml YPD inkl. 100 µCi [^{32}P]-Phosphat bis zur späten exponentiellen Phase angezogen, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und nach Entsalzung äquivalent Mengen mittels DC (LMB) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden erst autoradiographisch visualisiert (DC) und anschließend mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgewertet. Die relativen Werte sind als Querbalken dargestellt. IPC-III und IPC-IV wurden als IPC zusammengefaßt.

3.3.3. Der Einbau von exogenem DHS in Ceramid ist unabhängig von Ypc1p und Ydc1p

Angesichts der partiellen Revertierung des Lipidbiosynthesedefekts in *lag1*Δ*dgt1*Δ durch die Überexpression von *YPC1* und *YDC1* stellte sich die Frage, ob der fehlende Einbau von exogenem DHS in Ceramid im gleichen Maß wiederhergestellt wurde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen über Nacht mit [^{3}H]-DHS inkubiert, die Lipide extrahiert und nach Hydrolyse mittels DC analysiert (Abb. 3.26).

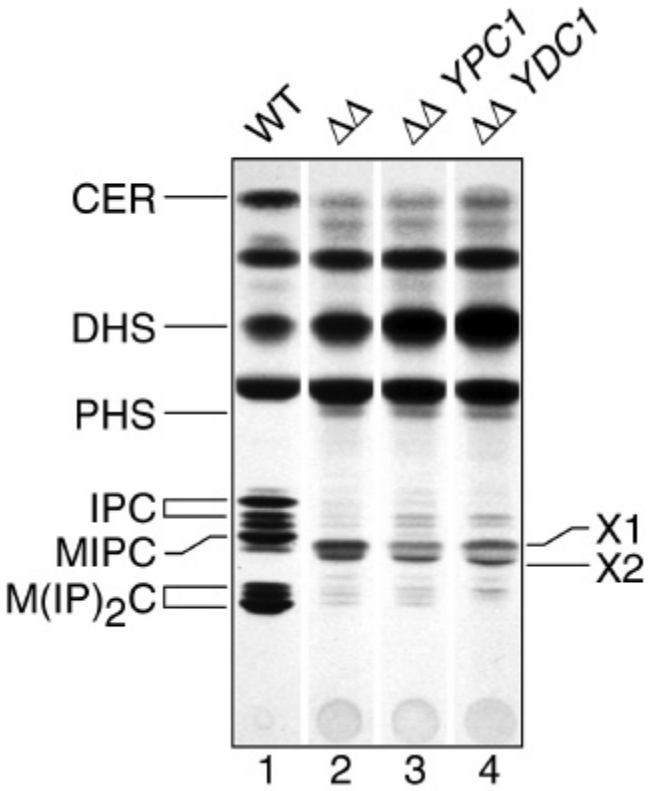


Abb. 3.26: Der Einbau von exogenen DHS in Ceramid ist abhängig von der Präsenz von *LAG1* und *DGT1* aber unabhängig von Ypc1p und Ydc1p. Wildtyp (WT; Spur 1), *lag1*Δ*dgt1*Δ (ΔΔ; Spur 2), *lag1*Δ*dgt1*Δ mit Überexpression von *YPC1* (ΔΔ *YPC1*) oder *YDC1* (ΔΔ *YDC1*) wurden über Nacht mit [^{3}H]-Dihydosphingosin markiert und die Lipide extrahiert. Nach milder, alkalischer Hydrolyse und Entsalzung wurden äquivalente Mengen an Lipidextrakten auf HPTLC-Platten aufgetragen, in LMB aufgetrennt und mittels Fluorographie visualisiert. Zwei bisher unbeschriebene Lipide sind als X1 und X2 bezeichnet.

*lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen, welche *YPC1* und *YDC1* überexpremieren, lassen minimale Tendenzen einer Erhöhung des Einbaus exogenen DHS in komplexe Sphingolipide erkennen. Im Vergleich zu den tatsächlichen Mengen an synthetisierten Sphingolipiden (Abb. 3.25) sind die hier erkennbaren Mengen aber zu vernachlässigen. Es kann demnach die Folgerung gezogen werden, daß der Einbau von exogenem DHS in Ceramid direkt von der Präsenz von Lag1p und Dgt1p abhängig ist und die Überexpression von *YPC1* und *YDC1* dies nicht auszugleichen vermag.

3.3.4. Die zusätzliche Deletion von *YPC1* und *YDC1* in *lag1*D*dgt1*D-Zellen inhibiert die Sphingolipidsynthese komplett

Ungefähr zu diesem Zeitpunkt, Ende 1999, veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Lina Obeid zwei Kommentare in der Hefedatenbank (http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces), denen zufolge *YPC1* für eine Phytoceramidase und *YDC1* für eine Dihydroceramidase kodieren sollen. Eine genaue Charakterisierung der Genprodukte folgte in den Veröffentlichungen Mao *et al.*, 2000a und Mao *et al.*, 2000b. Überaus interessant erscheint, daß *YPC1* in einem Ansatz isoliert wurde, der ursprünglich auf die Identifikation der CerS ausgerichtet war. So war es den Autoren möglich, den Wachstumsdefekt von Wildtypzellen unter dem Einfluß des CerS-Inhibitors FB1 durch Überexpression von *YPC1* partiell zu revertieren. Entsprechendes trifft auch auf *YDC1* zu, wenngleich in einem vergleichsweise geringeren Ausmaß. *In vitro*-Analysen zeigten schließlich, daß dieses Phänomen in einer reversen, FB1-resistenten Aktivität der Ceramidasen begründet liegt. Die Ceramidasen können demnach den FB1-induzierten Mangel an Ceramid durch deren ceramidsynthetisierende Aktivität zum Teil ausgleichen.

Es drängte sich somit die Frage nach einer möglichen Beteiligung von Ypc1p und Ydc1p an der restlichen, ceramidsynthetisierenden Aktivität in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen auf. Um dies zu beantworten, wurde ein Stamm, welcher neben der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletion die zusätzliche Deletion von *YPC1* und *YDC1* trug, über Nacht in der Gegenwart von [^{32}P]-P inkubiert in der Sphingolipidanteil im Vergleich zum Wildtyp analysiert (Abb. 3.27).

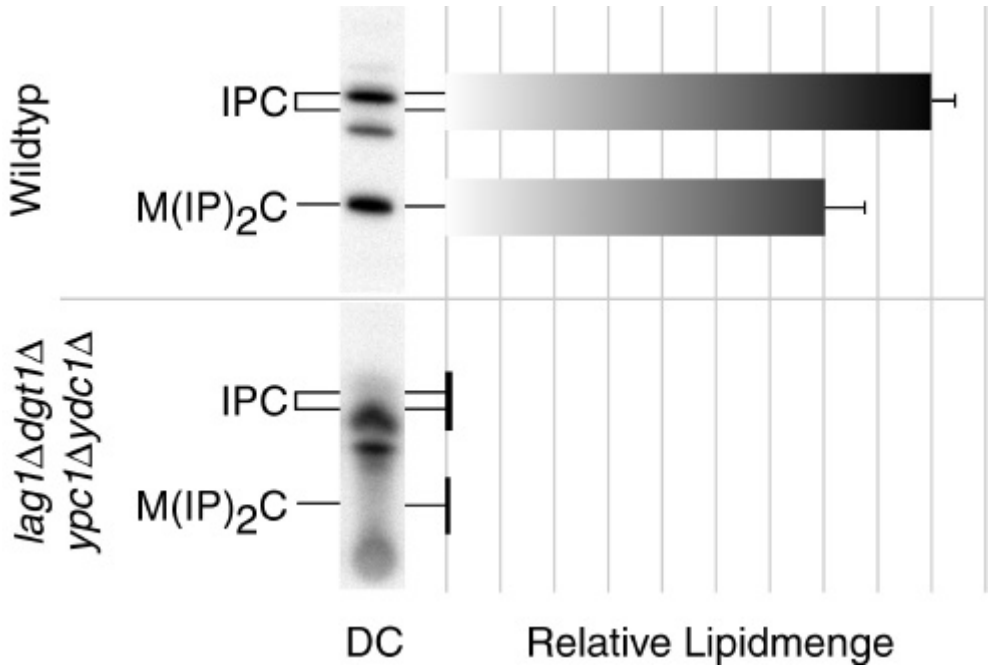


Abb. 3.27: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in *lag1*D*dgt1*D*ypc1*D*ydc1*D-Zellen. Wildtyp und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ wurden über Nacht in 1 ml YPD inkl. 100 µCi [^{32}P]-Phosphat bis zur späten exponentiellen Phase angezogen, die Lipide extrahiert, hydrolysiert und nach Entsalzung äquivalent Mengen mittels DC (LMB) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden erst autoradiographisch visualisiert (DC) und anschließend mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgewertet. Die relativen Werte sind als Querbalken dargestellt. IPC-III und IPC-IV wurden als IPC zusammengefaßt. Die prominenten Banden im Extrakt der Vierfachmutante entsprechen den uncharakterisierten Lipiden X1 und X2.

Es stellte sich heraus, daß in *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen die Mengen inositolhaltiger Sphingolipide unterhalb eines detektierbaren Niveaus liegen. Anstelle dessen sind X1 und X2, welche auch in der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante vorkommen, die prominentesten Banden. Dies bedeutet aber gleichzeitig, daß das vorhandene Ceramid in

*lag1*Δ*dgt1*Δ durch die reverse Aktion der Ceramidasen synthetisiert wird und bescheinigt somit Lag1p und Dgt1p eine essentielle Funktion in der CerS-Reaktion.

3.3.5. Ceramid ist für das Überleben der Zellen bei erhöhten Temperaturen oder nach Hitzeschock essentiell

Ceramid steuert als Sekundärbotenstoff einige zentrale Funktionen sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen (siehe Einleitung). Insbesondere in *S. cerevisiae* wurde die Sphingolipidsynthese im Zusammenhang mit der hitzeinduzierten Stressantwort untersucht. Es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 39 °C einen transienten Anstieg von Sphingoidbasen bewirkt, gefolgt von einer stabilen Erhöhung des Ceramidniveaus (Jenkins *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998). Darüberhinaus gab es Untersuchungen, denen zufolge Sphingoidbasen-Phosphate ebenfalls an der Regulation der Stressantwort beteiligt seien (Mandala *et al.*, 1998a; Skrzypek *et al.*, 1999). Da ein konstitutiver Block der CerS auf der Genomebene bis dato nicht möglich war, konnte eine Beteiligung von Ceramid in hitzeinduzierten Stressantwort nicht eindeutig geklärt werden.

Mit der Isolierung eines ceramidreduzierten (*lag1*Δ*dgt1*Δ) und eines ceramiddefizienten Stammes (*lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ) war nun die Möglichkeit zur Beantwortung dieser offenen Frage gegeben. Die Vorarbeiten zu dieser Dissertation zeigten, daß *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen in Flüssigmedium mit einer Teilungsrate ähnlich der der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen wachsen, jedoch eine Bildung von Einzelkolonien auf Agarplatten stark eingeschränkt ist. Um einen unmittelbaren Vergleich des temperaturabhängigen Wachstums von Wildtyp-, *lag1*Δ*dgt1*Δ- und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen zu erhalten, wurden die ensprechenden Stämme auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und bei RT oder 37 °C inkubiert

(Abb. 3.28). Bis auf ein höhere Teilungsrate bei 37 °C zeigt der Wildtyp keine offensichtlichen Unterschiede in Abhängigkeit der gewählten Umgebungstemperatur. Bei 24 °C wachsen beide Deletionsstämme mit einer zum Wildtyp vergleichsweise stark verringerten Teilungsrate. Wie bereits erwähnt, zeigt *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ im Vergleich zu *lag1*Δ*dgt1*Δ darüberhinaus eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung von Einzelkolonien. Bei 37 °C hingegen ist das Wachstum von *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen komplett inhibiert, das der Doppelmutante entspricht erstaunlicherweise dem der Vierfachmutante bei 24 °C, da *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen unter diesen Bedingungen zur Bildung von Einzelkolonien ebenfalls nicht mehr befähigt waren.

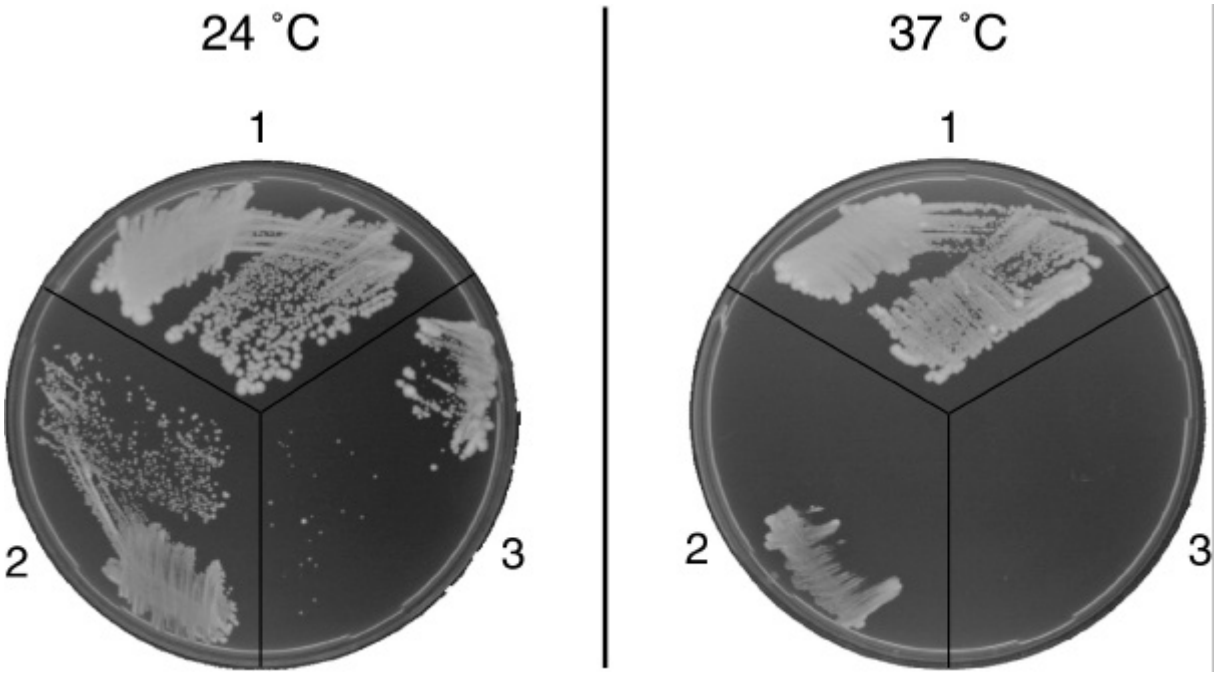


Abb. 3.28: Temperaturabhängiges Wachstum vom Wildtyp-, *lag1*D*dgt1*D- und *lag1*D*dgt1*D*ypc1*D*ydc1*D-Zellen. Wildtyp (1), *lag1*Δ*dgt1*Δ (2) und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ (3) wurden auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und bei 24 °C oder 37 °C für 2-5 Tage inkubiert.

Zur Analyse der Lebensfähigkeit der Zellen nach Hitzeschock wurden Flüssigkulturen aller drei Stämme für 15 min bei 42 °C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und schließlich auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Nach drei bis sechs Tagen Inkubation bei RT wurde die Kolonienzahl bestimmt und im Vergleich zur Negativkontrolle ausgewertet (Abb. 3.29).

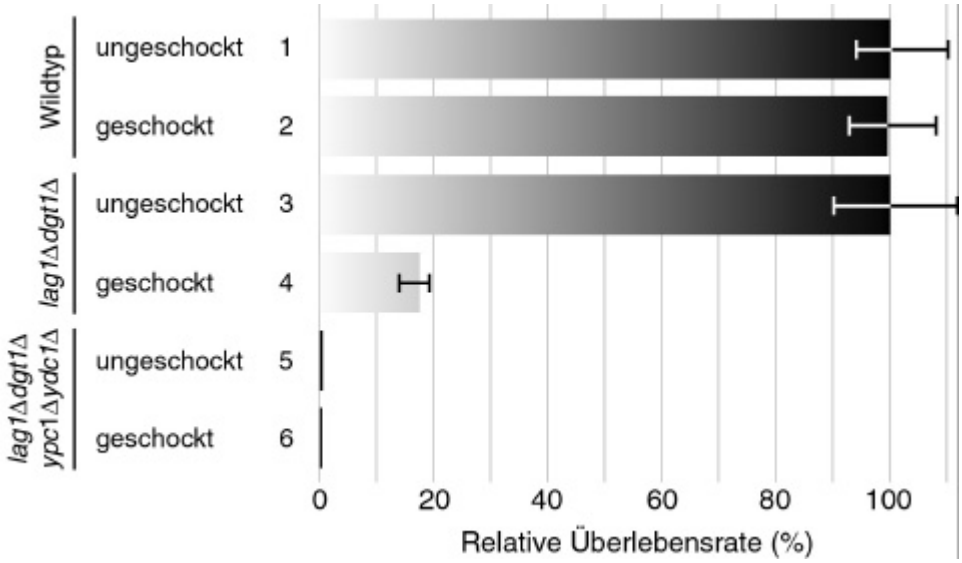


Abb. 3.29: Überlebensrate von Hefezellen nach Hitzeschock. Wildtyp- (Reihe 1 und 2), *lag1*Δ*dgt1*Δ- (Reihe 3 und 4) und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen (Reihe 5 und 6) wurden von einer frisch inkubierten YPD-Agarplatte in 1 ml YPD-Medium resuspendiert (ca. 5×10^4 Zellen) und auf zwei Aliquots aufgeteilt. Die Kulturen wurden für 15 min bei RT (ungeschockt; Reihe 1, 3 und 5) oder bei 42 °C (geschockt; Reihe 2, 4 und 6) inkubiert, zwei min auf Eis abgekühlt und schließlich auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Nach zwei bis sechs Tagen Inkubation bei RT wurde die Zellzahl bestimmt und die der ungeschockten Zellen auf 100 % festgelegt.

Geschockte Wildtypzellen wiesen sowohl in der Zahl der Kolonien als auch im Wachstum keinerlei nennenswerte Unterschiede zu der ungeschockten Kontrolle auf. Die Doppelmutante hingegen zeigte sich extrem sensitiv gegenüber dem kurzen Hitzeschock, da die Überlebensfähigkeit der geschockten Zellen im Vergleich zu dem der ungeschockten auf ca. 15 % reduziert war. Hefezellen mit der *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Vierfachdeletion wuchsen nach dieser Prozedur nicht mehr, evtl. aufgrund des zweiminütigen Kälteschocks.

4. DISKUSSION

4.1. Lag1p und Dgt1p: Essentielle Bestandteile der CerS

Die wichtigste Erkenntnis in der vorliegenden Dissertation ist die Identifikation von Lag1p und Dgt1p als redundante und essentielle Bestandteile der CerS-Reaktion. Diese Folgerung basiert auf einer Reihe von Beobachtungen (siehe auch Abb. 4.1).

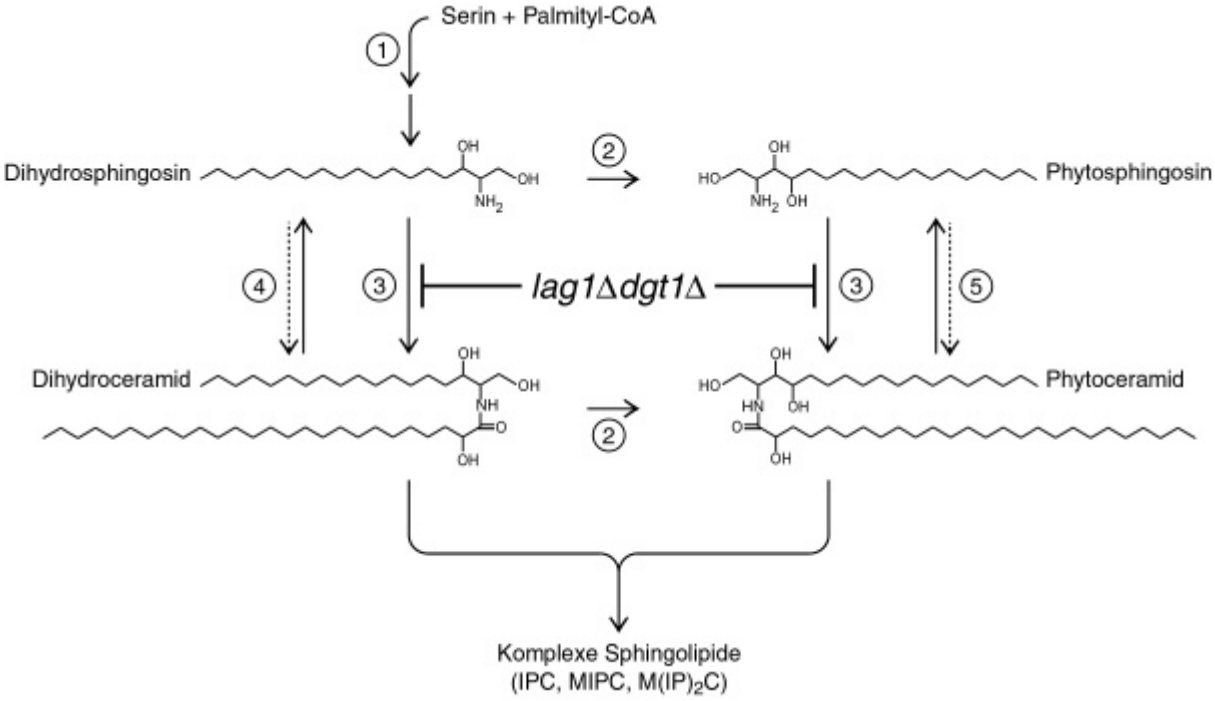


Abb. 4.1: Die *de novo*-Synthese von Ceramid in Hefe. Das Schema illustriert eine Zusammenfassung aller bekannten Daten zur *de novo*-Synthese von Ceramid. Die Kondensation von Serin und Palmitat führt nach einem anschließenden Reduktionsschritt zu DHS (1). DHS oder dessen hydroxylierte Form PHS (2) dienen beide als Substrat für die CerS-Reaktion (3), in welcher sie mit Hilfe einer CoA-aktivierten, sehr langen Fettsäure zu DHCer bzw. PHCer *N*-acyliert werden. Dieser Schritt benötigt die ER-Membranproteine Lag1p und Dgt1p und ist in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen komplett inhibiert. Die *N*-Acylbindung von DHCer bzw. PHCer kann unter Katalyse der Ceramidasen Ydc1p (4) bzw. Ypc1p (5) gespalten werden. Unter Bedingungen, welche einen Block der CerS entweder durch FB1 oder die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Deletion bewirken, sind beide Ceramidasen zur ceramidsynthetisierenden Umkehrreaktion befähigt (gekennzeichnet durch gestrichelte Pfeile). Nach dessen Fertigstellung wird Ceramid schließlich zum Golgi Apparat transportiert, wo es seine polaren Kopfgruppen erhält.

Erstens besitzen Hefezellen mit der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletion bedeutend geringere Mengen komplexer Sphingolipide, ein Phänotyp, welcher durch die Anwesenheit von plasmidkodiertem *LAG1* oder *DGT1* komplett revertiert wird. Der Grund für den apparenten Biosynthesedefekt liegt in einem Block der CerS-Reaktion begründet. Diese Aussage wurde in *in vivo*- und *in vitro*-Analysen unter Zuhilfenahme verschiedener radioaktiv markierter Sphingolipidvorstufen bewiesen. Zweitens sind *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen resistent gegenüber dem effizienten CerS-Inhibitor FB1. Darüberhinaus gleichen hydrolysierte Lipidextrakte aus FB1-behandelten Wildtypzellen denen aus *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen. Drittens: Die Überexpression der ceramidasekodierenden Gene *YPC1* und *YDC1* vermag sowohl den Wachstums- als auch den Sphingolipiddefekt des *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletionsstammes partiell zu revertieren. Diese Entdeckung entspricht der Beobachtung, daß die Überproduktion der Ceramidasen Ypc1p und Ydc1p Wildtypzellen eine gewisse Resistenz gegenüber einem FB1-induzierten Wachstumsdefekt verleihen (Mao *et al.*, 2000a; Mao *et al.*, 2000b). Die Ceramidasen sind somit fähig, eine Inhibierung der CerS durch ihre reverse, ceramidsynthetisierende und FB1-resistente Katalyse zu supprimieren. Viertens fehlen die restlichen Sphingolipide in *lag1*Δ*dgt1*Δ komplett, wenn die Zellen die zusätzlichen Deletionen *ypc1* und *ydc1* besitzen. Die ceramidsynthetisierende Aktivität in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* wird deshalb ausschließlich von den Ceramidasen bereitgestellt und belegt so das vollständige Fehlen der CerS-Aktivität in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen. Dies gibt somit Lag1p und Dgt1p eine essentielle Bedeutung von für die CerS-Reaktion.

4.2. Mögliche Funktionen für Lag1p und Dgt1p

4.2.1. Sind Lag1p und Dgt1p katalytisch aktiv?

Obwohl Lag1p und Dgt1p für die CerS essentiell sind, bewirkt deren Überproduktion im Wildtyp oder in ceramidasedefizienten Zellen keine Zunahme der Ceramid- oder Sphingolipidlevel. Diese Beobachtung läßt im ersten Moment eine katalytische Aktivität für Lag1p und Dgt1p unwahrscheinlich erscheinen. Unterstützt wird diese Annahme vor allem durch die Tatsache, daß die Überproduktion der Ceramidase Ypc1p entsprechend der äußeren Bedingungen sowohl die lytische als auch synthetische Aktivität in angereicherten Mikrosomen erhöht (Mao *et al.*, 2000a). Bei näherer Betrachtung kann trotzdem eine katalytische Funktion für Lag1p und Dgt1p nicht ausgeschlossen werden. Falls die CerS aus mehreren Untereinheiten besteht, könnte die Überexpression nur einer dieser Einheiten, z.B. *LAG1* und *DGT1*, für eine Zunahme der Aktivität nicht ausreichen. In Übereinstimmung mit dieser Idee fanden Shimeno *et al.* (1998) im Fall der CerS aus Rinderleber, daß die katalytische Aktivität nach partieller Proteinfraktionierung mit einem Proteinkomplex von 240-260 kDa assoziiert ist. Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Dissertation anhand von Koimmunopräzipitation gezeigt, daß Lag1p und Dgt1p in der Membran des ER interagieren. Die Vermutung liegt deshalb nahe, daß sie evtl. im Zusammenschluß mit anderen Proteinen als heteromerer Komplex vorliegen.

4.2.2. Regulieren Lag1p und Dgt1p die CerS-Aktivität?

Eine weitere Erklärung für die fehlende Zunahme der CerS-Aktivität in Korrelation mit der Überexpression von *LAG1* und *DGT1* könnte sein, daß die kodierten Proteine keine

katalytischen, sondern vielmehr enzymregulierende Einheiten darstellen und katalytischer Einheiten bedürfen. Andere Schritte der Sphingolipidbiosynthese benötigen beispielsweise mehr als ein Protein. Der SPT-Komplex, welcher die Kondensation von Serin und Palmitat zu KDHS katalysiert, besteht aus den drei molekular assoziierten Proteinen Lcb1p, Lcb2p und Tsc3p (Gable *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2000). Lcb2p scheint eine katalytisch aktive Einheit zu sein, da es die Bindestelle für Pyridoxalphosphat besitzt (Nagiec *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1994). Ebenso ist Lcb1p für die katalytische Aktivität von nöten (Zanolari *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu reduziert die Deletion von *TSC3* zum einen die SPT-Aktivität und senkt zum anderen die Konzentration der Substratinhibierung der SPT-Reaktion (Gable *et al.*, 2000). Es liegt deshalb nahe, daß Tsc3p in der Substratbindung involviert ist oder als regulatorische Einheit fungiert und auf diese Art und Weise für optimale SPT-Aktivität benötigt wird. Aufgrund der bedeutenden Eigenschaft von Ceramid als Signalmolekül wird die *in vivo*-Synthese dieses ungewöhnlichen Lipids höchstwarscheinlich streng kontrolliert. Es erscheint deshalb plausibel, daß die CerS, wie der SPT-Komplex, über regulatorische Einheiten verfügt.

4.2.3. Wirken Lag1p und Dgt1p substrataktivierend?

Interessanterweise werden in *lag1*Δ*dgt1*Δ zwar endogen synthetisierte Sphingoidbasen zu Ceramid konvertiert, exogenem [^{3}H]-DHS ist diese Metabolisierung jedoch größtenteils versagt. Einen ähnlichen Effekt verursacht die Deletion der Phosphatase Lcb3p. Die Kinasen Lcb4p und Lcb5p (Nagiec *et al.*, 1998) phosphorylieren DHS/PHS nach der Aufnahme, was eine anschließende Dephosphorylierung mittels Lcb3p oder Ysr3p (Mao *et al.*, 1997; Qie *et al.*, 1997; Zanolari *et al.*, 2000) erfordert, damit exogenes DHS letztlich als Substrat für die CerS bereitsteht oder zu PHS konvertiert werden kann. Die Lipidanalysen des *lag1*Δ*dgt1*Δ-

Stammes bewiesen jedoch eindeutig, daß sowohl Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* unbeeinträchtigt sind, da die Zellen exogenes DHS zu PHS konvertieren. Es läßt sich deshalb im Fall der *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppelmutante folgern, daß die Inhibierung der Inkorporation von exogenem DHS in Ceramid nach der Dephosphorylierung von DHS-1-P stattfindet. Bisher wird angenommen, daß nach der Dephosphorylierung und vor dem Einbau in Ceramid keine weitere Metabolisierung von Sphingoidbasen stattfindet. Vielleicht binden Lag1p und Dgt1p Sphingoidbasen, um sie zu aktivieren und der CerS zugänglich zu machen. Exogene Sphingoidbasen wären in der Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* gegenüber einem Verlust dieser aktivierenden Funktion sensitiver als endogene, da sie zuerst korrekt in die Membran inseriert werden müssen, bevor sie als Substrat für weitere Biosyntheseschritte zur Verfügung stehen. Interessanterweise besitzen alle Proteine der *LAG*-Familie ein hochkonserviertes Motiv in der vierten TMD. Dieses Motiv umfasst neben zwei Histidinresten im Grenzbereich der TMD zwei hydrophile Serin- bzw. Serin/Threoninreste innerhalb der hydrophoben Schicht. Ein ähnlich positionierter Histidinrest in Aur1p, ein essentieller Bestandteil der IPCerS, wird als bedeutend in der Substratbindung erachtet (Heidler und Radding, 1995). Analog wäre es denkbar, daß die Serin- bzw. Serin/Threoninreste an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der(den) Hydroxygruppe(n) der Sphingoidbasen in der Membran beteiligt sind.

4.3. Ceramid und der Transport GPI-verankerter Proteine

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, stellen GPI-verankerte Proteine eine eigene Klasse von Membranproteinen dar. Als Besonderheit besitzen sie keine klassischen TMD, sondern werden mit Hilfe eines charakteristischen Lipidankers mit der Membran assoziiert. Die Biosynthese dieses Ankers findet komplett im ER statt, nach dessen Fertigstellung das Vorläuferprotein mit dem Anker in einer ER-assozierten Transamidasereaktion verknüpft wird. Das fertige GPI-verankerte Protein wird danach vesikulär zum Golgi transportiert. Speziell dieser anterograde Transport benötigt zu seiner Effizienz einerseits eine funktionsfähige retrograde Transportmaschinerie (Sütterlin *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang wird der Rücktransport und somit die Wiederbereitstellung eines GPI-spezifischen Transportfaktors für den anterograden Transport vermutet. Ähnliche Transportfaktoren wurden bereits für andere Proteine identifiziert (Schimmoeller *et al.*, 1995; Belden und Barlowe, 1996; Kuehn *et al.*, 1996; Kuehn *et al.*, 1998; Gilstring *et al.*, 1999; Muniz *et al.*, 2000). Andererseits ist der ER-Golgi-Transport GPI-verankerter Proteine von der Sphingolipidbiosynthese abhängig. Eine temperatursensitive Mutante oder toxininhibierte Form der SPT resultiert in einer stark herabgesetzten Transportrate speziell dieser Membranproteine (Horvath *et al.*, 1994; Sütterlin *et al.*, 1997). Es war bisher allerdings nicht klar, ob sich das Fehlen der Sphingoidbasen oder das von Ceramid für diesen Effekt verantwortlich zeichnet.

Darüberhinaus existiert eine weitere Verbindung von Ceramid und GPI-verankerten Proteinen. Der GPI-Anker baut ursprünglich auf PI auf, also einem Glycerolipid. Nach der Verankerung mit dem Protein werden manche, aber nicht alle, DAG-Reste gegen ein Ceramid ausgetauscht (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1994). Dieser Austausch kann sowohl im

ER als auch im Golgi stattfinden (Reggiori *et al.*, 1997; Sipos *et al.*, 1997). Obwohl die eigentliche Austauschreaktion der der IPCerS sehr ähnlich ist, wird sie auf einem anderen, allerdings bisher unbekannten Weg bewerkstelligt (Reggiori und Conzelmann, 1998). Da die entsprechenden Gene für diesen Prozess bisher nicht identifiziert wurden, gibt es keine Daten hinsichtlich einer möglichen Abhängigkeit des Transports GPI-verankerter Proteine und der Ankermodifikation. Spekulationen schließen eine derartige Verbindung nicht aus.

Die Analysen in dieser Arbeit beleuchten das Verhältnis von Sphingolipiden und GPI-verankerten Proteinen ein wenig näher. Es muß einerseits die Tatsache in Betracht gezogen werden, daß der Block der SPT und jener der CerS den Transport GPI-verankerter Proteine in unterschiedlichen Ausmaß beeinflussen. Während die Inhibierung der SPT diesen Transport beinahe komplett stoppt, bewirkt die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Deletion nur eine Halbierung der Transportrate. Es sind demnach Sphingoidbasen, nicht aber Ceramid, für den Transport essentiell. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß Sphingoidbasen und Ceramid, trotz ihrer biosynthetischen Verwandtschaft, die Transporteffizienz GPI-verankerter Proteine auch ursächlich andersartig beeinflussen. Falls DHS/PHS ihre essentielle Bedeutung beispielsweise in Form von spezifischen Faltungshelfern oder Vermittlern der Vesikelformierung auspielten, könnte Ceramid die Transporteffizienz durch die Ausbildung von Mikrodomänen verstärken (Bagnat *et al.*, 2000; siehe auch Abb. 4.2), getrieben durch van-der-Waals-Kräfte entlang der C26-Acylketten (Schroeder *et al.*, 1994).

Gas1p, verantwortlich für den Aufbau der Zellwand (Nuoffer *et al.*, 1991; Popolo und Vai, 1999), und Yap3p, eine Aspartatprotease (Ash *et al.*, 1995), sind GPI-verankerte Proteine aus *S. cerevisiae*. Der ER-Golgi-Transport beider Proteine ist in Abwesenheit von *LAG1* und *DGT1* verlangsamt, allerdings wird Gas1p stärker retardiert als Yap3p (Barz und Walter, 1999). Analysen des Lipidankers zeigten, daß Gas1p einen DAG-basierten GPI-Anker besitzt

und nicht Substrat für die Austauschreaktion gegen Ceramid ist. Dies bedeutet, daß das Fehlen von Ceramid in *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen die Retardierung dieses GPI-verankerten Proteins nicht über einen Defekt in der Austauschreaktion begründet. Vielmehr scheint, unter Berücksichtigung aller Daten, eine uneffiziente Sortierung GPI-verankerter Proteine in Ermangelung der Ausbildung ceramidreicher Mikrodomänen stattzufinden.

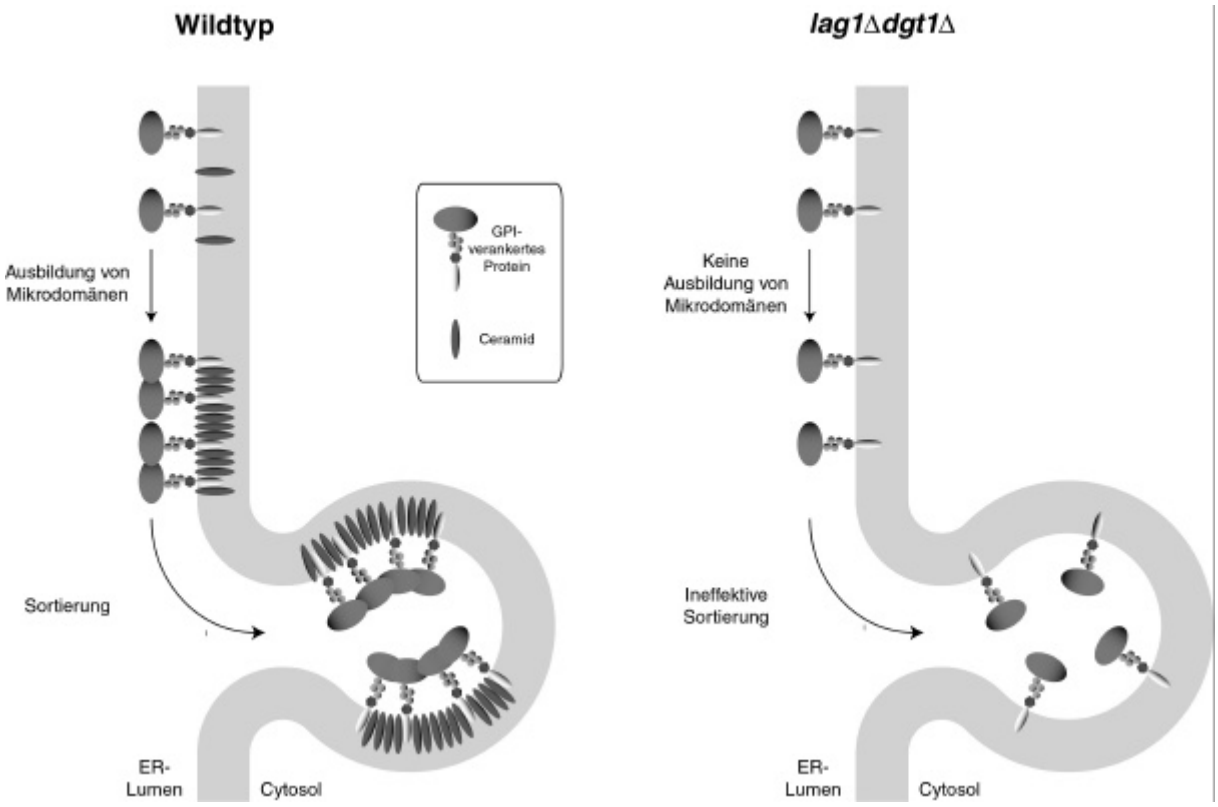


Abb. 4.2:Modell der ceramidvermittelten Sortierung GPI-verankerter Proteine in COPII-Vesikel. Die Synthese von Ceramid und GPI-verankerten Proteinen erfolgt im ER. In Wildtypzellen wechselwirkt der langkettige und gesättigte Lipidanker des Proteins mit dem Ceramid und führt so zu einer Ausbildung von Mikrodomänen in der Membran des ER. Diese Agglomeration bewirkt eine effektive Sortierung GPI-verankerter Proteine in COPII-Transportvesikel und in Folge deren Transport zum Golgi Apparat. Die *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletion inhibiert die Synthese von Ceramid via der CerS. Aufgrund dessen kommt es nicht zu einer Ausbildung von Protein-Lipid-Mikrodomänen, was sich in einer ineffektiven Sortierung und Transport GPI-verankerter Proteine auswirkt.

4.4. Ceramid und Hitzestress

Sphingolipide stehen in vielerlei Hinsicht mit zellulärer Stresstoleranz in Verbindung. Speziell im Zusammenhang mit der hitzeinduzierten Stressantwort gibt es in Hefe eine Reihe von Untersuchungen (Jenkins *et al.*, 1997; Mandala *et al.*, 1998a; Wells *et al.*, 1998; Skrzypek *et al.*, 1999), denen zufolge Sphingoidbasen und vor allem deren phosphorylierte Formen an der Hitzeresistenz beteiligt sind, wenngleich Ceramid eine mögliche Teilnahme an dieser Funktion nicht abgesprochen werden konnte. Die Ergebnisse in der vorliegenden Dissertation weisen nun eindeutig auf eine wichtige Rolle von Ceramid in der Hitzestressbewältigung hin. Zur Erklärung dieses Phänomens können im wesentlichen zwei Theorien herangezogen werden.

Die erste Theorie gründet auf der Eigenschaft von Ceramid als Sekundärbotenstoff. Ein wichtiger Faktor zur Bewältigung von Hitzestress ist in Hefe die Akkumulation von Trehalose (Parrou *et al.*, 1997). Das Gen *TPS2*, welches für ein Enzym in der Trehalosebiosynthese kodiert, kann auf der Transkriptionsebene mittels Hitze aktiviert werden (De Virgilio *et al.*, 1993; Gounalaki und Thireos, 1994; Sur *et al.*, 1994). Interessanterweise induziert die Behandlung von Zellen mit DHS ebenfalls eine Transsriptionsaktivierung von *TPS2* mit einer Effizienz von 133 % im Vergleich zu Hitze (Dickson *et al.*, 1997a). Diese Induktion ist spezifisch, da *HSP104* als ein weiteres hitzeinduzierbares Gen (Lindquist und Kim, 1996) von DHS in vernachlässigbarer Weise beeinflußt wurde. Die Eigenschaft von DHS als zellbiologisches Mimikry von Hitze ist mit der Hypothese konsistent, welche DHS, PHS oder Ceramid eine Rolle in der hitzeinduzierten Signaltransduktion zuschreibt (Dickson, 1998; Wells *et al.*, 1998).

Im Unterschied zu einer möglichen Signalwirkung könnte Ceramid auch als Grundbaustein von Sphingolipiden im Hitzestress von Nöten sein. Aufgrund ihres höheren Schmelzpunktes grenzen sich Sphingolipide zum einen in der Plasmamembran lateral von Glykolipiden ab (siehe Kap. 2.3.1) und verleihen darüberhinaus der Membran eine gewisse Festigkeit. Bei höheren Temperaturen könnte eben diesem Effekt eine große Bedeutung für die Zelle innewohnen. Es ist deshalb denkbar, daß es der Plasmamembran bei Ceramidmangel und Hitze an der nötigen Integrität fehlt, was zu einer reduzierten Lebensfähigkeit der Zellen führen könnte. Interessanterweise zeigten die Analysen in der vorliegenden Dissertation einen Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Ceramid und der Fähigkeit der Zellen zur Bildung von Einzelkolonien in Abhängigkeit der Temperatur auf. Möglicherweise stabilisieren sich Zellen im Verbund auf eine Art und Weise, die den Mangel an Ceramid unter Hitzeeinfluss supprimiert.

Vor kurzem brachten Chung *et al.* (2000) Sphingolipide in einen neuen und sehr bedeutenden zellulären Zusammenhang. Sie zeigten, daß vornehmlich PHS während Hitzeschock die ubiquitinabhängige Proteolyse via des 26S-Proteasoms induziert. Andere Sphingolipide, wie auch das Ceramidanalogon C2-Ceramid, hatten keinen oder weitaus geringeren Einfluß auf die Proteindegradation. Es ist allerdings zu bedenken, daß sich C2-Ceramid vom natürlich vorkommenden Ceramid vor allem in seiner geringeren Hydrophobizität deutlich unterscheidet und deshalb als ebenbürtiges Substitut fragwürdig ist. Neben einer Reihe weiterer Stressstimuli aktiviert Hitze die Transkription von *UBI4*, eines Gens, welches für das Ubiquitinvorläuferprotein Ubi4p kodiert. Erstaunlicherweise steht Ubi4p in den Studien von Chung *et al.* (2000) in keinerlei nennenswerter Verbindung zu PHS-vermittelten Proteolyse. Anders ist die Beobachtung, daß die Überexpression von *UBI4* sowohl den temperatursensitiven Phänotyp der *lcb1-100* Mutante als auch, erst vor kurzen

gefunden, den der konstitutiven *lag1*Δ*dgt1*Δ-Doppeldeletion supprimiert (H. Riezman, pers. Mitteilung). Ceramid könnte demnach ebenfalls als Sekundärbotenstoff an der ubiquitinvermittelten Hitzestressantwort beteiligt sein.

4.5. Ist Ceramid essentiell ?

Ceramid ist von immenser Bedeutung in der Signaltransduktion von Säugerzellen (siehe Einleitung). Dennoch war die Frage in der obigen Überschrift bisher nicht eindeutig zu beantworten, da in Ermangelung des Wissens um CerS-kodierende Gene kein konstitutiver Block der Ceramidsynthese installiert werden konnte. Als einzige Möglichkeit, die Biosynthese dieses Lipids zu inhibieren, bot sich der Einsatz einer Reihe von CerS-Inhibitoren wie FB1 oder Australifungin. Diese Naturstoffe hatten aber den Nachteil, daß sie pleiotrope und auch ceramidunabhängige Effekte hervorriefen (Jenkins *et al.*, 2000). In der vorliegenden Dissertation wurde nun ein Hefestamm identifiziert, welcher aufgrund der Deletionen der Gene *LAG1*, *DGT1*, *YPC1* und *YDC1* Defekte in allen bekannten *de novo*-Synthesewegen von Ceramid aufweist. Umfassende Analysen des Vierfachdeletionsstammes *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ ergaben, daß die Zellen lebensfähig waren, obwohl sie offensichtlich über keine detektierbaren Mengen an Ceramid oder Sphingolipiden verfügten. Dies erschien im ersten Moment äußerst sonderbar, da der gängigen Meinung nach Sphingolipide als essentiell erachtet werden (Übersicht in Daum *et al.*, 1998; Dickson, 1998; Dickson und Lester, 1999b; Dickson und Lester, 1999a). In einem einzigen bekannten Fall können Zellen mit einer Deletion des *LCB1*-Gens überleben, indem sie eine weitere Punktmutation im Gen *SLC1* tragen (Dickson *et al.*, 1990; Nagiec *et al.*, 1993). *SLC1* kodiert für eine *sn2*-Fettsäureacyltransferase (Zou *et al.*, 1997). Vermutlich erlaubt es die Punktmutation *slc1-1*

dem modofizierten Protein, DAG mit C26-Fettsäuren in der *sn2*-Position zu synthetisieren. Als Folge davon wurden in der ensprechenden Mutante Lipide identifiziert, welche Sphingolipiden strukturell ähneln, d.h. DAG-C26 anstelle Ceramid besitzen (Lester *et al.*, 1993), und deshalb vermutlich einige der essentiellen Funktionen von Sphingolipiden übernehmen können. Ähnlich dem supprimierten *lcb1*-Stamm besitzen *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen zwei ungewöhnliche Lipide X1 und X2, welche im Wildtyp nicht oder nur in sehr viel geringeren Mengen vorkommen. Diese Lipide sind alkalistabil und werden von Inositol, Serin, Palmitat, DHS, Phosphat aber nicht Mannose markiert, eine Tatsache, die sie zwar von denen aus *slc1-1*-Zellen deutlich unterscheidet, eine supprimierende Funktion für den Ceramiddefizit aber nicht ausschließt.

Will man aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse eine essentielle Bedeutung von Ceramid in Frage stellen, so sollte man bedenken, daß der *lag1*Δ*dgt1*Δ- oder der daraus entstandene *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Deletionsstamm möglicherweise eine unidentifizierte Suppressormutation besitzt, die den Zellen ein Überleben ohne Ceramid erlaubt. Es gibt zwei Hinweise, die eine derartige Idee fördern. Zum einen existieren *lag1*Δ*dgt1*Δ-basierte Stämme, welche zusätzliche, synthetisch letale Punktmutationen besitzten (pers. Mitteilung Wolfgang Barz). Hefegenetische Methoden bewiesen, daß die zusätzlichen Mutationen aller Stämme auf ein und derselben Komplementationsgruppe liegen. Obwohl das mutierte Gen bisher nicht identifiziert wurde, wäre es denkbar, daß es in Analogie zu der *slc1-1*-Mutation einen Ceramiddefekt ausgleicht. Einen weitereren Hinweis liefert die Arbeitsgruppe um Michal Jazwinski, welche Lag1p als erstes im Zusammenhang mit der Zellalterung beschrieben haben (D'Mello *et al.*, 1994). Sie zeigten, daß die *lag1*Δ- und *dgt1*Δ(*lac1*Δ)-Deletionen synthetisch letal sind und ein *lag1*Δ*dgt1*Δ-Stamm somit nicht lebensfähig war (Jiang *et al.*,

1998). Im Unterschied zu den Analysen in der vorliegenden Dissertation verwendeten Jazwinski und Mitarbeiter einen anderen Wildtyp als Basis, eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen Phänotyp.

Generell muß bedacht werden, wenngleich *lag1*Δ*dgt1*Δ- und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen unter Laborbedingungen lebensfähig sind, daß sie dieses aufgrund ihrer stark reduzierten Stressresistenz in der natürlichen Umgebung vermutlich nicht wären. Das gilt im besonderen Maße für Säugerzellen, welche aufgrund ihres höheren Anpassungsgrades empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen sind. Die in der letzten Überschrift provokant gestellte Frage, ob Ceramid biologisch essentiell sei, kann unter Berücksichtigung all dieser Aspekte eindeutig mit ja beantwortet werden. So gesehen liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Klärung dieses biologischen Sachverhalts.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anderweitig ausgewiesen, wurden alle Chemikalien in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenhofen, BRD), Merck (Darmstadt, BRD) oder ICN (Eschwege, BRD) bezogen. Enzyme stammten von den Firmen La Roche (Mannheim, BRD) oder New England Biolabs (Beverly, CA, USA).

5.1.2. Radioisotope

[^{32}P]-P (10 mCi/ml in H_2O), [^{3}H]-Ino (1 mCi/ml in H_2O), [^{14}C]-Ser (1 mCi/ml in H_2O) und [^{3}H]-PA (1 mCi/ml in Ethanol) stammten von Amersham (Uppsala, Schweden), [^{3}H]-DHS (1 mCi/ml in Ethanol) wurde von BioTrend Chemikalien (Köln, BRD) bezogen.

5.1.3. Puffer

10-fach ATPregS	20 mM HEPES/KOH pH 6,8, 250 mM Sorbitol, 150 mM KCH_3COO, 5 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 10 mM ATP, 400 mM Kreatinphosphokreatin, 2 mg/ml Kreatinphosphokinase
BP	120 mM Tris, 3,5 % SDS [w/v], 14 % Glycerin [v/v], 8 mM EDTA, 120 mM DTT
CM	Chloroform/Methanol 1/1 [v/v]

CMW	Chloroform/Methanol/H_2O 10/10/3 [v/v/v]
DP	5 % TCA
ES	Ethanol/H_2O/Diethylether/Pyridin 15/15/5/1 [v/v/v/v]
ESN	Ethanol/H_2O/Diethylether/Pyridin/NH_4OH 15/15/5/1/0,018 [v/v/v/v/v]
FSE	Hexan/Diethylether 1/1 [v/v]
LMA	Chloroform/Methanol/0.25 % KCl 55/45/10 [v/v/v]
LMB	Chloroform/Methanol/4,2 N NH_4 9/7/2 [v/v/v]
LMC	Chloroform/Essigsäure 9/1 [v/v]
P1	50 mM NaCl, 10 mM NaN_3
P2	100 mM Tris/SO_4 pH9,4, 10 mM DTT, 10 mM NaN_3
P3	25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 1,4 M Sorbitol, 5 mM $_{MgCl2}$, 10 mM DTT, 10 mM NaN_3
P4	25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 1,9 M Sorbitol, 5 mM $_{MgCl2}$, 10 mM NaN_3
P5	10 mM HEPES/KOH pH 7.5, 200 mM Sorbitol, 150 mM KCH_3COO, 5 mM $_{MgCl2}$, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A
P6	10 mM HEPES/KOH pH 7.5, 200 mM Sorbitol, 150 mM KCH_3COO, 5 mM $_{MgCl2}$, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin [v/v], 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A
P7	100 mM Tris/SO_4 pH9,4, 10 mM DTT
P8	10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,7 M Sorbitol, 1,5 % Pepton [w/v], 0,75 % Hefeextrakt [w/v], 0,5 % Glukose [w/v]
P9	20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 0,8 M Saccharose, 1,5 % Ficoll 400 [w/v]
P10	20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 100 mM Sorbitol, 50 mM KCH_3COO, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A
P11	20 mM HEPES/KOH pH 6,8, 250 mM Sorbitol, 150 mM KCH_3COO, 5 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A
PIPLCP	50 mM Tris/HCl pH7,5, 1 mM EDTA, 20 % Propanol

PLATE	10 mM Tris/HCl pH7,5, 4,5 % PEG 4000, 100 mM $LiCH_3COO$, 1 mM EDTA
Poinceaulsg.	0,2 % Poinceau, 5 % CH_3COOH
TCAL	20 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NH_4CH_3COO, 2 mM EDTA, 10 % TCA
TCAR	100 mM Tris, 3 mM DTT, 3 % SDS
Towbinpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 25 % Methanol

5.1.4. Kultivierungsmedien

10-fach YNB (Hefestickstoffbasis mit Vitaminen und Spurenelementen)

7 % Hefestickstoffbasis (Difco, Detroit, MI, USA) wurden in H_20 gelöst und sterilfiltriert. YNB ohne Inositol wurde entsprechend der Vorschrift von Culbertson und Henry (1975) zusammengestellt und sterilfiltriert.

10-fach DS (Supplementelösung)

0,6 g Adeninsulfat, 0,3 g Uracilhydrochlorid, 0,8 g Tryptophan, 0,6 g Histidinhydrochlorid, 0,2 g Argininhydrochlorid, 0,2 g Methionin, 0,3 g Tyrosin, 0,8 g Leucin, 0,3 g Isoleucin, 0,3 g Lysinhydrochlorid, 0,5 g Phenylalanin, 1 g Glutaminsäure, 1 g Asparaginsäure, 1,5 g Valin, 2 g Threonin und 2 g Serin wurden in 1 l H_2O gelöst, auf pH 7,5 eingestellt und sterilfiltriert. Für die Herstellung von selektiven Medien wurden die ensprechenden Supplemente weggelassen.

25-fach Glukoselösung

500 g Glukose wurden in 1 l H_2O bei ca. 50 °C unter Rühren gelöst und anschließend sterilfiltriert.

10-fach Galaktoselösung

200 g Galaktose wurden in 1 l H_2O bei ca. 50 °C unter Rühren gelöst und anschließend sterilfiltriert.

YPD-Medium

2 % Glukose, 2 % Pepton und 1 % Hefeextrakt wurden zusammen autoklaviert.

YPD-Agarplatten

2 % Glukose, 2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt und 2 % Agar-Agar wurden zusammen autoklaviert, auf ca. 70 °C abgekühlt und mit je 0,005 % Trp und Ade supplementiert.

SC-Medium

Zu 760 ml sterilem H_2O in einer 1000 ml Schottflasche wurden sterile 100 ml 10-fach YNB, 100 ml 10-fach DS und 40 ml 25-fach Glukoselösung gegeben.

SG-Medium

Zu 700 ml sterilem H_2O in einer 1000 ml Schottflasche wurden sterile 100 ml 10-fach YNB, 100 ml 10-fach DS und 100 ml 10-fach Galaktoselösung gegeben.

LB-Medium

1 % Trypton, 1 % NaCl und 0,5 % Hefeextrakt wurden zusammen autoklaviert. Für LB-Agarplatten wurde zusätzlich 1,5 % Agar-Agar zugegeben, die Lösung nach dem

Autoklavieren auf ca. 70 °C abgekühlt und im Bedarfsfall mit 100 mg/l Ampicillin und 20 mg/l Kanamycin supplementiert.

5.1.5. Verwendete Stämme

Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme:

Name	Genotyp	Referenz
W303-1A	MATa *ade2-1 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-1 can1-100*	Deshaies und Schekman, 1990
W303-1B	MATα *ade2-1 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-1 can1-100*	Deshaies und Schekman, 1990
WBY286	W303-1A *dgt1*Δ::*ADE2*	Barz und Walter, 1999
WBY616	W303-1B *dgt1*Δ::*ADE2 lag1*Δ::*HIS3*	Barz und Walter, 1999
WBY743	W303-1A *dgt1*Δ::*ADE2 lag1*Δ::*HIS3* [pWB96]	Barz und Walter, 1999
WBY777	W303-1B *dgt1*Δ::*ADE2 lag1*Δ::*HIS3* [pWB98]	Barz und Walter, 1999
WBY783	W303-1B *dgt1*Δ::*ADE2 lag1*Δ::*HIS3* [pWB783]	W. Barz
WBY824	W303-1A *dgt1*Δ::*ADE2 lag1*Δ::*HIS3* [pWB824]	W. Barz
WBY822	WBY616 *ypc1*Δ::*LEU2 ydc1*Δ::*TRP1*	W. Barz
STY2.1	WBY286 [pWB94]	diese Arbeit
STY18	WBY616 [pWB96, pWB98]	diese Arbeit
STY23	W303-1A [pSTS30]	diese Arbeit
STY25	W303-1A [pSTS30b]	diese Arbeit
STY18	WBY616 [pWB96, pWB98]	diese Arbeit
STY100	WBY616 [pRW12]	diese Arbeit
STY101	WBY616 [pRW13]	diese Arbeit
STY102	WBY616 [pRW14]	diese Arbeit
STY103	WBY616 [pWB94]	diese Arbeit
STY104	WBY616 [pRS314]	diese Arbeit
STY105	W303-1B [pRS314]	diese Arbeit

Verwendete *E. coli*-Stämme:

Name	Genotyp	Referenz
DH5-α	F$^-$ *end*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+) *sup*E44 *thi*-1 λ$^-$ *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 ϕ80d *lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F9) U169	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
Top10F'	F' *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZX74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 D(*ara*,*leu*)7697 *gal*U *gal*K *rsp*L (streptomycinr) *end*A1 *nup*G	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

5.1.6. Verwendete Plasmide

Name	Bemerkungen	Referenz
$pESC_{URA}$	2µ *URA3*; zwei mcs mit Sequenzen für *c-myc*- und *flag*-Epitop unter Kontrolle von *GAL1/10*	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pRS314	*CEN6 ARSH4 TRP1*	Sikorski und Hieter (1989)
pWB94	*CEN6 ARSH4 TRP1 DGT1-HA*	Barz und Walter (1999)
pWB96	*CEN6 ARSH4 TRP1 DGT1*	Barz und Walter (1999)
pWB98	*CEN6 ARSH4 URA3 LAG1*	Barz und Walter (1999)
pWB783	2µ *LEU2 YPC1*	W. Barz
pWB824	2µ *LEU2 YDC1*	W. Barz
pRW12	*CEN6 ARSH4 TRP1* 5'-deletiertes *DGT1-HA*	diese Arbeit
pRW13	*CEN6 ARSH4 TRP1* 3'-deletiertes *DGT1-HA*	diese Arbeit
pRW14	*CEN6 ARSH4 TRP1 DGT1-HA*(K419L;K420Q)	diese Arbeit
pSTS30a	$pESC_{URA}$ *LAG1-MYC*	diese Arbeit
pSTS30b	$pESC_{URA}$ *DGT1-FLAG*	diese Arbeit
pSTS30	$pESC_{URA}$ *LAG1-MYC DGT1-FLAG*	diese Arbeit

5.1.7. Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
ON 1	5‘-CTCGAGATGACATCAGCTACGGACAAATC-3‘
ON 2	5‘-GCTAGCTTATTCACACTTTTCCTTAGATTCTTC-3‘
ON 3	5‘-AGATCTCGACAATAAAGCCAAGCCCTTC-3‘
ON 4	5‘-TTAATTAATCAAATATCCTTTTTCGTTGGAGTAC-3‘
ON 5	5‘-ACATATGATGTTCCAGATTACGCTAGTTACCGTCATGCCTGGATAG-3‘
ON 6	5‘-GATTGGCAGTCCCATTTTAGTG-3‘
ON 7	5‘-TACCGTCATGCCTGGATAGCTC-3‘
ON 8	5‘-CAAATATCCTTTTTGAGAATACCTCTCCATAGAATCC-3‘
ON 9	5‘-GGAGAGGTATTCTCAAAAAGGATATTTGAAGGAAAACGG-3‘
ON 10	5‘-TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG-3‘
ON 11	5‘-CAAATATCCTGCAGCGTTGGAGTACTGTCAGTTGGAG-3‘
ON 12	5‘-GTACTCCAACGCTGCAGGATATTTGAAGGAAAACGGTG-3‘

5.1.8. Verwendete Antikörper

Primäre monoklonale Antikörper

Anti-HA-IgG 16B12 (BabCo, Richemond, CA, USA)

Anti-MYC-IgG 9E10 (BabCo, Richemond, CA, USA)

Anti-FLAG-IgG M2 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Primäre polyklonale Antikörper

Anti-Emp24p-pk (Howard Riezman, Biozentrum of the University of Basel, Basel, CH)

Anti-Sec61p-pk (Peter Walter, University of California Medical School, San Francisco, CA, USA)

Anti-Kar2p-pk (Peter Walter, University of California Medical School, San Francisco, CA, USA)

Sekundäre POD-gekoppelte Antikörper

Anti-Maus-IgG aus Ziege (Sigma, Deisenhofen, BRD)

Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Sigma, Deisenhofen, BRD)

5.2. Mikrobiologische Methoden

5.2.1. Kultivierung und Anzucht von *S. cerevisiae*

Zur Konservierung von Hefestämmen wurden ca. 100 OD_{600}ml Zelläquivalente in 1 ml sterilem 30 % Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Zur zwischenzeitlichen Lagerung bei 4 °C wurden die Stämme alle zwei Wochen auf Agarplatten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigkulturen erfolgte gewöhnlich bei 30 °C und 150 upm in Erlenmeyerglaskolben, welche zu einem Fünftel ihres Fassungsvermögens mit Medium gefüllt waren. Zur konstitutiven Expression von Genen unter dem *GAL1/10* wurden die Zellen in SG-Medium angezogen. Die Zellernte wurde in Abhängigkeit des Volumens mit 1000 g für 5-10 min durchgeführt.

5.2.2. Transformation von *S. cerevisiae*

Im Zuge dieser Dissertation waren keine hocheffizienten Transformationsmethoden nötig. Um Plasmide in Hefezellen zu transformieren, wurden ca. 20 OD_{600}ml von einer frisch inkubierten Agarplatte in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, 100 µg Träger-DNA sowie 1 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und der Ansatz in 500 µl PLATE resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend 4-20 h bei RT inkubiert und 50-100 µl nach kurzem Durchmischen auf selektive SC-Agarplatten ausplattiert.

5.2.3. Radioaktive *in vivo*-Pulsmarkierung von *S. cerevisiae*

Pulsmarkierung mit [^{3}H]-INO (Puoti *et al*., 1991)

Exponentiell wachsende Zellen wurden zwei mal in SC-Medium ohne Inositol gewaschen, 3 OD_{600}ml in 600 µl Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert, und bei 37 °C für 15 min präinkubiert. Zur Markierung wurden 20 µCi [^{3}H]-INO hinzugefügt und die Kultur für weitere 20 min inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe von 620 µl YPD-Medium inkl. 80 µg/ml Inositol und eine weitere Inkubation für 60 min. Die Reaktion wurde mit je 10 mM NaN_3 und NaF auf Eis gestoppt und die Zellen zwei mal mit kaltem H_2O inkl. 10 mM NaN_3 und NaF gewaschen.

Pulsmarkierung mit [^{3}H]-DHS und [^{3}H]-PA

Exponentiell wachsende Zellen wurden zwei mal in SC-Medium gewaschen 1 OD_{600}ml in 1 ml SC-Medium in einem sterilen 15 ml Glasröhrchen resuspendiert. Im Bedarfsfall wurden die Zellen vor der Markierung mit 100 µM FB1 (Calbiochem, Bad Soden, BRD) und/oder 20 µg Myriocin für 2 h bei 30 °C und 230 upm präinkubiert. Anschließend

wurden 2 µCi [^{3}H]-DHS oder 5 µCi [^{3}H]-PA hinzugefügt und die Zellen für die angegebene Dauer weiterinkubiert.

5.2.4. Radioaktive *in vivo*-Langzeitmarkierung von *S. cerevisiae*

Exponentiell wachsende Zellen wurden in 5 ml Medium inkl. der entsprechend markierten Sonde auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und ÜN bei 30 °C kultiviert. Vor der Zellernte wurde die OD_{600} einer 1:20 Verdünnung der Kultur gemessen. Die Markierungsbedingungen waren folgende: 50 µCi [^{3}H]-INO in SC-Medium ohne Inositol, 50 µCi [^{3}H]-PA in SC-Medium, 5 µCi [^{14}C]-Serin in SC-Medium ohne Serin, 10 µCi [^{3}H]-DHS in SC-Medium, 500 µCi [^{32}P]-P in YPD.

5.2.5. Standardmethoden zum Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung, Anzucht und Transformation von *E. coli* erfolgte nach den standardisierten Methoden von Sambrook *et al.* (1989).

5.3. Molekularbiologische Methoden

5.3.1. Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsspaltung

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Volumen von 15-200 µl unter den von New England Biolabs bzw. La Roche angegebenen Bedingungen. Um 1 µg DNA zu spalten wurde 1-20 U Restriktionsendonuklease eingesetzt.

Ligation

Für einen Ligationsansatz von 10 µl wurden etwa 200 µg DNA eingesetzt. Sollte ein Vektor mit einem DNA-Fragment ligiert werden, wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:3 bis 1:10 eingesetzt.

Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung der Phosphatgruppen am 5'-Ende von linearer Vektor-DNA verhindert die Religation. Die Phosphatase aus Kälberdarm wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Entfernung des Enzyms nach der Reaktion erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit nachfolgender Elution des Vektorfragments aus der Agarose.

5.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die dafür verwendeten Gele enthielten je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,7-1,5 % Agarose [w/v] in TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit DNA-Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 70-200 mA durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden durch Inkubieren des Geles für 30 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente wurde über den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard bestimmt.

5.3.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren wurden die Gelblöcke, die die mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden enthielten, ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

5.3.4. Polymerasekettenreaktion

Diese Methode wurde benutzt um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Die Reaktion wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers mit TaKaRa LA Taq™ DNA-Polymerase (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan) in einem GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT) durchgeführt. Die Zyklusprogrammierung war wie folgt:

	30 Zyklen			1 Zyklus
	Denaturierung	Anlagerung	Amplifikation	Elongation
Temperatur:	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C
Dauer:	20 sec	20 sec	60 sec/kBp	7 min

Alle zur Klonierung gedachten PCR-Produkte wurden anschließend entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den pCR2.1-Klonierungsvektor mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) kloniert und in *E. coli* transformiert. Um bestimmte DNA-Fragmente in *E. coli* nachzuweisen, wurden komplette Zellen (ca. 1 mittelgroße Kolonie von der Agarplatte) direkt in den PCR-Ansatz eingesetzt. Der PCR-

Reaktion wurde hierfür ein einmaliger Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min vorgeschaltet und die Zyklusanzahl auf 35 erhöht.

5.3.5. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Dabei wurden basenspezifisch fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide verwendet (PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Detektion und Auswertung der Signale erfolgte an einem DNA-Sequenzer. Ein Gesamtansatz von 14 µl enthielt 0,5 µg Plasmid-DNA, 5 nmol ON und 3 µl Reaktionsfertigmix. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler wie folgt durchgeführt:

	30 Zyklen	
	Denaturierung	Anlagerung/Amplifikation
Temperatur:	95 °C	60 °C
Dauer:	20 sec	4 min

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden der Ansatz über MicroSpin G-50 Säulen gereinigt. Dazu wurden die geöffneten Säulen bei 2000 g für 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde der Sequenzierungsansatz aufgetragen und wiederum 1 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde nachfolgend in einem Speed Vac Concentrator getrocknet. Der Ansatz wurde anschließend nach den Protokollen des Herstellers am DNA

Sequenzer analysiert und mit dem Programm “Sequence Navigator” (ABI, Weiterstadt, BRD) ausgewertet.

5.3.6. Plasmidisolierung aus *E. coli*-Stämmen

5 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli*-Zellen wurden 10 min bei 7000 g pelletiert. Um Plasmide hoher Reinheit zu isolieren, wurden der QIAprep Spin Miniprep Kit und der QIAGEN Plasmid Midi Kit nach den Protokollen des Herstellers verwendet.

5.3.7. Klonierung von pSTS30 und Derivaten

LAG1 wurde mittels PCR und den ON 1 und 2 aus pWB98 amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Das XhoI/NheI-Fragment aus pCR2.1 inkl. *LAG1* wurde ausgeschnitten und in den ensprechend geöffneten $pESC_{URA}$ kloniert, um somit pSTS30a zu generieren. *DGT1* wurde mittels PCR und den ON 3 und 4 aus pWB96 amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Anschließend wurde *DGT1* mit Hilfe von BglII und PacI ausgeschnitten und in pSTS30a bzw. $pESC_{URA}$ kloniert. Dies führte zu den Plasmiden pSTS30 bzw. pSTS30b. Die Klonierung von *LAG1* und *DGT1* in $pESC_{URA}$ versah die kodierten Proteine mit einem N-terminalen *c-myc*- bzw. *flag*-Epitop.

5.3.8. Klonierung von pRW12, pRW13 und pRW14

Die 5’-Deletion von *DGT1-HA* wurde durch Amplifikation eines 630 bp Fragments 240 bp stromabwärts des Startkodons von *DGT1* aus pWB94 mit den ON 5 und 6 erreicht. Nach Klonierung in pCR2.1 wurde das verkürzte NdeI-Fragment dazu benutzt, das originale

NdeI-Fragment aus pWB94 zu ersetzen und somit pRW12 zu formieren. Um die 3'-Deletion von *DGT1-HA* zu erhalten, wurden die partiell überlappenden PCR-Produkte aus den Reaktionen pWB94 mit ON 7 und 8 sowie pWB94 mit ON 9 und 10 direkt in eine dritte PCR-Reaktion mit ON 7 und 10 eingesetzt. Das Amplifikat aus der dritten Reaktion wurde zuerst in pCR2.1 kloniert, um anschließend mit AgeI und XhoI wieder ausgeschnitten und in den ensprechen verdauten pWB94 kloniert zu werden. Das neue Plasmid wurde pRW13 benannt. Eine ähnliche Strategie fand zur Mutation der zwei Lysine K419 und K420 des Dilysinmotivs von Dgt1p-Ha zu Leucin und Glutamin Anwendung. Die Produkte der PCR mit pWB94 als Vorlage und ON 7 und 11 sowie 10 und 12 wurden direkt in eine dritte Reaktion mit ON 7 und 10 eingesetzt. Der pCR2.1 Vektor mit der Sequenz für das mutierte Dilysinmotiv wurde schließlich mit den Enzymen AgeI und XhoI verdaut und die Originalsequenz aus pWB94 damit ersetzt. Dies führte zum Plasmid pRW14.

5.4. Proteinchemische Methoden

5.4.1. Gewinnung von Lysaten aus *S. cerevisiae*

3 OD_{600}ml Hefezellen wurden in 500 µl TCAL resuspendiert, ca. zur Hälfte mit Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) aufgefüllt und zwei mal für 1 min auf höchster Stufe gevortext. Der ÜS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Glasperlen mit 200 µl TCAL gewaschen und der Ansatz nach Vereinigung der ÜS bei 14000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Nach vollständiger Abnahme des TCA-haltigen ÜS wurde das Pellet in 50 µl TCAR resuspendiert.

5.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen

Zur Bestimmung des Proteingehalts in freien Lösungen als auch in resuspendierten Membranfraktionen fand das kommerziell erhältliche BCA-Reagenzset der Firma Pierce (IL, USA) Verwendung. Die Vorgehensweise erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

5.4.3. SDS-PAGE von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE erfolgte modifiziert nach Laemmli (1970). Die Proben wurden zur Vorbereitung in BP resuspendiert (1 OD_{600}ml Hefezelllysat in 50 µl; 50 µg Protein in 10 µl) und für 20 min bei 60 °C denaturiert. Das Gießen der Gele (0,75 mm oder 1,5 mm Schichtdicke) wurde in einer SDS-Gel-Gießkammer (Mighty Small Multiple Gel Caster; Höfer) durchgeführt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Flüssigkeit mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichförmige Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit Sammelgel-Lösung überschichtet und die Kämme für die späteren Probentaschen eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (Protogel) verwendet. Die Durchführung der SDS-Gelektrophorese erfolgte in einer SE 250 Mighty Small II Laufkammer, in die die gegossenen Gele eingesetzt wurden. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und gewöhnlich 10 µl Probe in je eine Probentasche gefüllt. Die Elektrophorese fand bei konstant 15-20 mA pro Gel unter Wasserkühlung statt.

5.4.4. Western-Blot

Für den Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Protran Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schüll, Dassel, BRD) nach dem Naßblotverfahren wurden ein Transfertank der Firma Höfer verwendet. Der Zusammenbau des Blotkäfigs und der Transfer erfolgte ensprechend den Angaben des Herstellers. Zur transienten Visualisierung der Proteine wurde die Membran für 2 min mit frischer Poinceaulösung unter Schwenken inkubiert und anschließend mit destilliertem H20 gewaschen. Die rötlich gefärbten Marker banden wurden mit einem weichen Bleistift nachgezogen.

5.4.5. Immunologische Detektion mittels Chemolumineszenz

Die immunologische Detektion spezifischer Proteinbanden auf Nitrocellulosemembranen erfolgte mit Hilfe des „BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD)“ (La Roche, Mannheim, BRD) enstprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Antikörperverdünnungen waren wie folgt: anti-HA-IgG 1:1000, anti-MYC-IgG, 1:1000, anti-FLAG-IgG 1:1000, anti-Sec61p-pk 1:1000, anti-Emp24p-pk 1:4000, anti-Kar2p-pk 1:5000, POD-gekoppelter anti-Maus-IgG 1:2000, POD-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG 1:2000.

5.4.6. Solubilisierung von Membranproteinen

Alle Reaktion geschahen bei 4 °C. Mikrosomale Fraktionen in P6 wurden auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt und durch Pipettieren homogenisiert. Anschließend wurde ein äquivalentes Volumen von doppelt konzentriertem Detergenz in P6 hinzugefügt, im

Potter-Elvehjem Homogenisator durchmischt und der Ansatz für 30 min im Überkopfschüttler inkubiert. Die Abtrennung von unlöslichem Material erfolgte durch Zentrifugation in einer Beckmann (Fullerton, CA, USA) TLA100 Tischzentrifuge und einem TLA100.3 Rotor mit 100000 g für 30 min.

5.4.7. Native Immunpräzipitation solubilisierter Membranproteine

Generell geschahen alle Reaktion bei 4 °C, die Inkubationen erfolgten im Überkopfschüttler und die ÜS wurden von der Sepharose durch Zentrifugation mit 500 g für 30 sec abgetrennt. Zur Vorbereitung wurde die lyophylisierte ProtA-S (Pharmacia, Freiburg, BRD) ÜN in P6 zur Quellung eingeweicht, am nächsten Tag drei mal mit P6 gewaschen und im Volumenverhältnis 1:1 mit P6 inkl. des für die Solubilisierung verwendeten Detergenz (P6D) aufgefüllt. Gewöhnlich wurden 150 µl des solubilisierten ÜS aus Kap. 5.4.6 für einen Ansatz zur nativen Immunpräzipitationen verwendet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde der Ansatz mit 40 µl ProtA-S für 30 min vorinkubiert und der ÜS in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurden 4-6 µg Antikörper hinzugefügt und der Ansatz 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 40 µl ProtA-S und eine weitere Inkubation für 90 min. Nach dieser Zeit wurde der ÜS abgenommen und das Pellet vier mal mit P6D gewaschen. Während des vierten Waschschrittes erfolgte die Überführung des Pellets in ein neues Reaktionsgefäß, wo es schließlich in 50 µl BP aufgenommen und für SDS-PAGE vorbereitet wurde.

5.5. Lipidanalytische Methoden

5.5.1. Lipidextraktion nach Hanson und Lester (1980)

Diese Methode diente zur quantitativen Extraktion von Phospholipiden aus Hefezellen und wurde standardmäßig angewendet. 30 OD_{600}ml Zellen wurden geerntet, in 1 ml kaltem DP resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in ein teflonbeschichtetes, verschraubbare Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und die Zellen zwei mal mit H_2O gewaschen. Die Extraktion erfolgte in zwei Durchgängen in je 300 µl ESN bei 60 °C für 15 min. Die ÜS wurden in einem neuen Reaktionsgefäß vereint und entweder in der SpeedVac getrocknet oder direkt entsprechend Kap. 5.5.4 weiterverarbeitet.

5.5.2. Lipidextraktion nach Puoti *et al.* (1991)

Anders als die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Methode diente die nach Puoti *et al.* (1991) durchgeführte Lipidextraktion der Analyse von Lipidsyntheseraten zu definierten Zeitpunkten. Die Zellen wurden hierfür in 500 µl CMW resuspendiert, der Ansatz mit 500 mg Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) aufgefüllt und in vier Durchgängen für je 30 sec gevortext. Der ÜS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Glasperlen mit 300 µl CMW gewaschen und die ÜS nach Vereinigung in der SpeedVac getrocknet.

5.5.3. Lipidmodifikation mit PIPLC

Die getrockneten Lipide (ensprechend dem Extrakt von ca. 1 OD_{600}ml Zellen) wurden in 50 µl PIPLCP resuspendiert und mit 0,05 IU PIPLC für 2 h bei 30 °C verdaut. Die Lipide

wurden anschließend mittels butanolischer Partionierung (siehe Kap. 5.5.5) extrahiert.

5.5.4. Milde alkalische Hydrolyse von Lipiden

Zur Spaltung der Fettsäureacylester von DAG-basierten Lipiden (Becker und Lester, 1980) wurden die getrockneten Lipide in 250 µl ES resuspendiert und mit 250 µl 0,2 N methanolischer KOH verdünnt. Nach 60 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz mit 50 µl 1 N Essigsäure neutralisiert und in der SpeedVac getrocknet.

5.5.5. Entsalzung von Lipidextrakten

Restliche Proteine und Salze in Lipidextrakten wurden mittels butanolischer Partitionierung entfernt (Krakow *et al.*, 1986). Die getrockneten Lipide wurden hierfür in 150 µl Butanol (gesättigt mit H_2O) resuspendiert und eine Phasentrennung durch Zugabe von 75 µl H_2O erreicht. Nach kräftigem Durchmischen wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und die obere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere wässrige Phase wurde mit 75 µl Butanol (gesättigt mit H_2O) reextrahiert, die organischen Phasen vereint und der Ansatz in der SpeedVac getrocknet.

5.5.6. Liposomenpräparation

Die Lipide oder Fettsäuren wurden wurden in den gewünschten Mengen in CM vollständig gelöst und in der SpeedVac eingedampft. Der Lipidfilm wurde in aufsteigenden Volumina mit der Pipette resuspendiert und anschließend durch je fünf alternierende 2 min

Behandlungen im Ultraschallbad und motorbetriebenen Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert.

5.5.7. DC von Lipiden

Gewöhnlich wurden 5-15 µl Lipidextrakte, welche in CMW gelöst waren, auf HPTLC-Aluminiumplatten (10 × 10 cm Kieselgel 60; Merck, Darmstadt, BRD) in einem Abstand von 1,5 cm vom unteren Rand und 1 cm zwischen den Auftragspunkten aufgetragen. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte in Glaskammern, welche mit Filterpapier ausgeschlagen und 120 min zuvor mit dem Laufmittel äquilibriert wurden. Als Laufmittel dienten LMA (Puoti *et al.*, 1991), LMB (Becker und Lester, 1980) oder LMC (Morell und Radin, 1970). Wenn die Laufmittelfront ca. 2 mm unterhalb der oberen Plattenkante erreicht hatte, wurde der Lauf gestoppt und die Platte an der Luft getrocknet.

5.5.8. Visualisierung von Lipiden

Die Identifizierung von Lipiden auf DC-Platten erfolgte mit Hilfe authentischer Standards, welche mit der Probe oder als externe Markerspur aufgetragen wurden.

Kupferschwärzung

Die DC-Platten wurden mit einer Lösung aus 10 % $CuSO_4 \times 5H_2O$ und 8 % H_3PO_4 besprüht, kurz an der Luft getrocknet und anschließend 20-30 min bei 160 °C entwickelt. Alle Lipide verkohlten nach dieser Methode und waren als schwarze Banden sichtbar.

Orcinfärbung

Diese Methode diente der spezifischen Färbung von Glykolipiden. Die DC-Platten wurden hierfür zuerst mit einer 2 % [w/v] ethanolischen Orcinlösung besprüht, kurz an der Luft getrocknet und anschließend mit wenig 75 % H_2SO_4 besprüht. Die Entwicklung erfolgte für 10 min bei 100 °C. Glykolipide erschienen als rote bis violette Banden.

Fluorographie

Die Visualisierung [^{3}H]- oder [^{14}C]-markierter Lipide erfolgte mittels EN^{3}HANCE (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA), welches nach der Chromatographie direkt auf die Platten gesprüht wurde. Die so behandelten DC-Platten wurden anschließend XOMAT Röntgenfilmen (Kodak) für 2-6 Tage bei –80 °C exponiert.

Phosphoimager

Zur Quantifizierung [^{32}P]-P-markierter Lipide wurde die DC-Platte einer Detektionsplatte im Dunkeln bei RT für ca. 60 min exponiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines FLA2000 Phosphoimagers (Fuji Photo Film, Tokyo, J) und der Herstellersoftware.

5.5.9. Fettsäureanalytik

Die Präparation von Fettsäuremethylestern aus Hefezellen geschah im wesentlichen nach der Methode von (Oh *et al.*, 1997). 100 OD_{600}ml Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet und zwei mal in H_2O gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 20 ml 3 N methanolischer HCl resuspendiert, in einen 100 ml Glasrundkolben überführt und für 20 h unter Rückflußkühlung gekocht. Die Extraktion der Fettsäuremethylester aus der Lösung

erfolgte in vier Durchgängen mit je 5 ml FSE. Die vereinigten ÜS wurden anschließend durch Zugabe von H20freiem $NaSO_4$ entwässert und in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Die Extrakte wurden schließlich zur Analyse in FSE in einem Verhältnis von 1 % [w/v] resuspendiert. Die Analyse und Quantifizierung der Methylester erfolgte mittels kombinierter GC/MS in einem Finnigan MAT 95 doppelt fokusierenden Massenspektrometer, welcher mit einer EI Ionenquelle bei 70 eV ausgestattet war. Die Probentrennung geschah auf einem Varian GC 3400 Gaschromatographen mit einer DB-5ms Silikakapillarsäule (30 m × 0,25 mm, 0,1 µm Schichtdicke) und Helium als Trägergas. Jeweils 0,2-0,4 µl Probenvolumen wurden bei konstant 300 °C injiziert. Das Temperaturprogramm war 2 min isothermisch 200 °C, gefolgt von einem linearen Anstieg mit 5 K/min auf 300 °C und schließlich 10 min isothermisch 300 °C.

5.6. Supramolekulare Zellchemie

5.6.1. Mikrosomenpräparation mit mechanischer Lyse

Hefezellen wurden in SC-Medium bis zur frühen exponentiellen Phase (ca. 10^7 Zellen/ml) bei 30 °C angezogen. 30 OD_{600}ml Zelläquivalente wurden abzentrifugiert und zwei Mal in 5 ml P1 gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 3 ml P2 resuspendiert, für mindestens 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend pelletiert. Zum Verdau der Zellwand wurden die Zellen in 1,5 ml P3 resuspendiert, 150 µg Zymolyase hinzugefügt und bei 30 °C für 30-60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz des Verdaus wurde durch die Abnahme der OD_{600} einer 1:100 Verdünnung in H_20 kontrolliert. Sobald diese weniger als 20 % der Startdichte betrug, wurden der Ansatz in einem 50 ml

Falcongefäß über 20 ml P4 geschichtet und mit 5000 g in einem Ausschwingrotor bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das resultierende Sphäroplastenpellet wurde an dieser Stelle entweder in flüssigem N_2 eingefroren und bei –80 °C gelagert oder wie folgt weiterverarbeitet. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte bei 4 °C ausgeführt. Das Pellet wurde zur Lyse in 300 µl P5 resuspendiert, ca. zur Hälfte mit Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) aufgefüllt und in vier 30 sec Zykeln bei eindrittel der Kraft sanft gevortext. Der ÜS wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Glasperlen mit 300 µl P5 gewaschen, und nach Vereinigung beider ÜS das Zelllysat mit 200 g bei 4 °C für 5 min pelletiert. Der resultierende ÜS mit den mikrosomalen Fraktionen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet ein zweites Mal lysiert. Die Membranfraktionen beider Aufschlüsse wurden vereint, in einer TLA100 Ultrazentrifuge (Beckmann, Fullerton, CA, USA) in einem TLA100.2 Rotor mit 27000 g bei 4 °C für 10 min pelletiert und abschließend zwei mal in P6 gewaschen (Ogg *et al.*, 1992)

5.6.2. ER-Präparation mit osmotischer Lyse

100 OD_{600}ml exponentiell wachsende Hefezellen wurden geerntet, in 1 ml P7 resuspendiert, für mindestens 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend pelletiert. Zum Verdau der Zellwand wurden die Zellen in 1 ml P8 resuspendiert, 500 µg Zymolyase hinzugefügt und bei 30 °C für 30-60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz des Verdaus wurde durch die Abnahme der OD_{600} einer 1:200 Verdünnung in H20 kontrolliert. Sobald diese ca. 5 % der Startdichte betrug, wurden der Ansatz in einem 50 ml Falcongefäß über 15 ml P9 geschichtet und mit 5000 g in einem Ausschwingrotor bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das resultierende Sphäroplastenpellet

wurde an dieser Stelle entweder in flüssigem N_2 eingefroren und bei –80 °C gelagert oder wie folgt weiterverarbeitet. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte bei 4 °C ausgeführt. Die Sphäroplasten wurde in 1 ml P10 resuspendiert und in einem motorbetriebenen Potter-Elvehjem Homogenisator mit zehn langsamen Ab- und Aufwärtsbewegungen osmotisch lysiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1000 g für 10 min, um Zellkerne, Zelldebris und Mitochondrien zu pelletieren. Der ÜS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet ein zweites Mal lysiert. Die vereinigten mikrosomalen Fraktionen wurden in einer TLA100 Ultrazentrifuge (Beckmann, Fullerton, CA, USA) in einem TLA100.3 Rotor mit 27000 g bei 4 °C für 10 min pelletiert und anschließend in 100 µl P10 aufgenommen. Um Vakuolen und Golgimembranen abzutrennen, wurde die Mikrosomenfraktion über einen Schrittgradienten (1 ml 1,2 M Saccharose in P10 über 1 ml 1,5 M Saccharose in P10) überschichtet und mit 100000 g für 60 min in einem Kontron TST55.5 Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Membranen, welche sich an der Interphase angesammelt hatten und größtenteils aus rauhem ER bestanden, wurden entnommen, mit P11 1:5 verdünnt, mit 27000 g pelletiert und zwei mal in P11 gewaschen (Wuestehube und Schekman, 1992).

5.6.3. Cytosolpräparation

Alle Schritte nach der Zellernte erfolgte bei 4 °C. 2000 OD_{600}ml exponentiell wachsende Hefezellen wurden geerntet, zwei mal in 20 ml P11 gewaschen und schließlich in 1 ml P11 in einem 30 ml Corex Glasröhrchen resuspendiert. Nach Zugabe von 4 g Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) wurden die Zellen in zehn 30 sec Zykeln unter starkem vortexen aufgebrochen. Das Lysat wurde durch zwei Zentrifugationsschritte (27000 g 10 min, 300000

g 60 min; Beckmann TLA100.3 Rotor) geklärt und der ÜS (Cytosol) in flüssigen N_2 portioniert eingefroren.

5.6.4. Limitierte Proteolyse von Dgt1p-HA

Alle Lösungen wurden vor dem Versuch auf 4 °C eingestellt. Als Quelle für die Mikrosomenfraktion dienten STY2.1-Zellen, welche nach der Methode von Ogg *et al.* (1992) fraktioniert wurden. Ein Ansatz enthielt in 100 µl P5 100 µg Membranproteine, 10 ng Protease K und ensprechend den Bedingungen 0,5 % SDS [w/v]. Die Reaktion wurde durch Überführung der Ansätze in einen auf 37 °C vorgeheizten Heizblock gestartet. 15 µl Aliquots wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und die Reaktion auf Eis durch Zugabe von je 10 mM PMSF und IAS gestoppt. Die Proben wurden mit 15 µl BP verdünnt und mittels SDS-PAGE in einem 12 %-igen Gel aufgetrennt. Nach Überführung der denaturierten Proteine mittels Western Blot wurde das HA-Epitop mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers und verstärkter Chemoluminiszenz visualisiert. Anschließend wurde die Membran von den Antikörpern befreit und zur Detektion von Kar2p ein zweites Mal mit Anti-Kar2p-Antikörper behandelt.

5.6.5. Analyse *in vitro*-generierter COPII-Transportvesikel

Die *in vitro*-Formierung und Analyse von COPII-Transportvesikeln erfolgte nach der Anleitung von Wuestehube und Schekman (1992). STY2.1-Zellen dienten als Quelle für die Membranfraktion (Kap. 5.6.2) und Wildtypzellen für die Präparation des Cytosols. Ein Vesikelsyntheseansatz in 500 µl P11 bestand aus 100 µg Membranprotein, 1,2 mg Cytosol, 1

mM GDP-Man, 0,1 mM GDP-PNP und 50 µl 10-fach ATPregS. Die Reaktion erfolgte bei RT für 2 h. Als Kontrollen dienten 5 IU Apyrase anstelle von ATPregS, ein Ansatz ohne Cytosol oder Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurden die Donormembranen durch Zentrifugation mit 12000 g für 10 min bei 4°C entfernt und die Vesikel aus dem Überstand durch einem zweiten Zentrifugationsschritt mit 100000 g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Die Analyse der Donormembranen und der Vesikelfraktion erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

5.6.6. Bestimmung der *in vitro*-Aktivität der CerS

Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen dienten als Quelle für die ER-Membranpräparation (Kap. 5.6.2) sowie Wildtypzellen für die Bereitstellung des Cytosols (Kap. 5.6.3). Ein Reaktionssansatz enthielt in 50 µl P11 200 µg Membranprotein, 100 µg Cytosol, 5 µl ATPregS, 50 µM GDP-Man, 40 pmol DHS und 10 pmol [^{3}H]-DHS (0,5 µCi), welcher gegebenenfalls mit 1 µM Australifungin für 15 min bei 10 °C präinkubiert wurde. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µM CoA und einem liposomalen Gemisch aus C26-Fettsäure und PI (50 µM und 250 µM), gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 24 °C. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit mit 333 µl CM gestoppt (pers. Mitteilung H. Riezman und B. Vallée).

5.6.7. Bestimmung der *in vivo*-Aktivität der IPCerS

2×10^8 exponentiell wachsende *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen wurden geerntet, zwei mal mit 1 ml mit SC-INO gewaschen, in 0,5 ml SC-INO resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 25 µCi [^{3}H]-INO für weitere 15 min

inkubiert. Im Bedarfsfall wurde das Medium zusätzlich zur Radioaktivität mit je 40 µM C2-Ceramid oder C6-Ceramid supplementiert. Um Lipide als Produkte der IPCerS zu identifizieren, erfolgte die Markierung gegebenenfalls in der Gegenwart von 50 nM des IPCerS-Inhibitors AbA. Die Lipide wurden anschließend wie in Kap. 5.5.2 beschrieben extrahiert (pers. Mitteilung H. Riezman und B. Vallée).

6. REFERENZEN

Ahmed, S.N., Brown, D.A. und London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry (Mosc.)*, **36**, 10944-10953.

Ash, J., Dominguez, M., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. und Bourbonnais, Y. (1995) The yeast proprotein convertase encoded by *YAP3* is a glycophosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20847–20854.

Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 3254-3259.

Balsinde, J., Balboa, M.A. und Dennis, E.A. (1997) Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D-1 macrophages via sphingomyelin synthesis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20373-20377.

Barz, W.P. und Walter, P. (1999) Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1043-1059.

Becker, G.W. und Lester, R.L. (1980) Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.*, **142**, 747-754.

Beeler, T., Bacikova, D., Gable, K., Hopkins, L., Johnson, C., Slife, H. und Dunn, T. (1998) The Saccharomyces cerevisiae *TSC10*-YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca-2+-sensitive *csg2*Δ mutant. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30688-30694.

Beeler, T., Gable, K., Zhao, C. und Dunn, T. (1994) A novel protein, Csg2p, is required for Ca2+ regulation in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7279-7284.

Beeler, T.J., Fu, D., Rivera, J., Monaghan, E., Gable, K. und Dunn, T.M. (1997) *SUR1* (*CSG1/BCL21*), a gene necessary for growth of Saccharomyces cerevisiae in the presence of high Ca2+ concentrations at 37 °C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol. Gen. Genet.*, **255**, 570-579.

Begum, N., Ragolia, L. und Srinivasan, M. (1996) Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat skeletal muscle cells. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 214-220.

Belden, W.J. und Barlowe, C. (1996) Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26939-26946.

Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M. und Conzelmann, A. (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.*, **15**, 6575-6583.

Bielawska, A.E., Shapiro, J.P., Li, J.A., Melkonyan, H.S., Piot, C., Wolfe, C.L., Tomei, L.D., Hannun, Y.A. und Umansky, S.R. (1997) Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am. J. Pathol.*, **151**, 1257-1263.

Bose, R., Verheij, M., Haimovitzfriedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. und Kolesnick, R. (1995) Ceramide Synthase Mediates Daunorubicin-Induced Apoptosis - an Alternative Mechanism for Generating Death Signals. *Cell*, **82**, 405-414.

Brown, D.A. und Rose, J.K. (1992) Sorting Of Gpi-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains During Transport to the Apical Cell Surface. *Cell*, **68**, 533-544.

Chatterjee, S., Han, H., Rollins, S. und Cleveland, T. (1999) Molecular cloning, characterization, and expression of a novel human neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37407-37412.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. und Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-122.

Chung, N., Jenkins, G., Hannun, Y.A., Heitman, J. und Obeid, L.M. (2000) Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17229-17232.

Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R.L. und Desponds, C. (1992) Two Different Types Of Lipid Moieties Are Present In Glycophosphoinositol-Anchored Membrane Proteins Of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **11**, 457-466.

Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. und Letourneur, F. (1996) Delta- and Zeta-Cop, Two Coatomer Subunits Homologous to Clathrin-Associated Proteins, Are Involved In Er Retrieval. *EMBO J.*, **15**, 1792-1798.

Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C. und Letourneur, F. (1998) New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.*, **17**, 6863-6870.

Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*, **78**, 461–471.

Cruzeiro-Hansson, L., Ipsen, J.H. und Mouritsen, O.G. (1989) Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, **979**, 166-176.

Culbertson, M.R. und Henry, S.A. (1975) Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **80**, 23-40.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, J.S. und Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381**, 800-803.

Cuvillier, O., Rosenthal, D.S., Smulson, M.E. und Spiegel, S. (1998) Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2910-2916.

Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. und Dickson, R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, **14**, 1471-1510.

De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jeno, P., Boller, T. und Wiemken, A. (1993) Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 315-323.

Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1987) A Yeast Mutant Defective At an Early Stage In Import Of Secretory Protein Precursors Into the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.*, **105**, 633-646.

Dickson, R.C. (1998) Sphingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae: Comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 27-48.

Dickson, R.C. und Lester, R.L. (1999a) Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 305-321.

Dickson, R.C. und Lester, R.L. (1999b) Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 347-357.

Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G.B. und Lester, R.L. (1997a) Sphingolipids are potential heat stress signals in Saccharomyces. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30196-30200.

Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Wells, G.B., Nagiec, M.M. und Lester, R.L. (1997b) Synthesis of mannose-(inositol-P)-2-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces* cerevisiae, requires the *IPT1* (YDR072c) gene. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29620-29625.

Dickson, R.C., Wells, G.B., Schmidt, A. und Lester, R.L. (1990) Isolation Of Mutant *Saccharomyces cerevisiae* Strains That Survive Without Sphingolipids. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2176-2181.

D'Mello, N.P., Childress, A.M., Franklin, D.S., Kale, S.P., Pinswadsi, C. und Jazwinski, S.M. (1994) Cloning and characterization of *LAG1*, a longevity-assurance gene in yeast. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15451-15459.

Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C. und Hannun, Y.A. (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15523-15530.

Doering, T.L. und Schekman, R. (1996) GPI Anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. *EMBO J.*, **15**, 182-191.

Dunn, T.M., Haak, D., Monaghan, E. und Beeler, T.J. (1998) Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in Saccharomyces cerevisiae requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b-5-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast*, **14**, 311-321.

Finley, D., Ozkaynak, E. und Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, **48**, 1035-1046.

Fishbein, J.D., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Garrett, S. und Hannun, Y.A. (1993) Ceramide-Mediated Growth Inhibition and Capp Are Conserved In *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9255-9261.

Flury, I., Benachour, A. und Conzelmann, A. (2000) YLL031c belongs to a novel family of membrane proteins involved in the transfer of ethanolaminephosphate onto the core structure of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J. Biol. Chem.*, **275**, 24458-24465.

Friant, S., Zanolari, B. und Riezman, H. (2000) Increased protein kinase or decreased PP2A activity bypasses sphingoid base requirement in endocytosis. *EMBO J.*, **19**, 2834-2844.

Friedrichson, T. und Kurzchalia, T.V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, **394**, 802-805.

Fukasawa, M., Nishijima, M. und Hanada, K. (1999) Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.*, **144**, 673-685.

Gable, K., Slife, H., Bacikova, D., Monaghan, E. und Dunn, T.M. (2000) Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7597-7603.

Gaynor, E.C., te Heesen, S., Graham, T.R., Aebi, M. und Emr, S.D. (1994) Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.*, **127**, 653-665.

Gilstring, C.F., Melin-Larsson, M. und Ljungdahl, P.O. (1999) Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3549-3565.

Gounalaki, N. und Thireos, G. (1994) Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J.*, **13**, 4036-4041.

Grilley, M.M., Stock, S.D., Dickson, R.C., Lester, R.L. und Takemoto, J.Y. (1998) Syringomycin Action Gene *SYR2* Is Essential For Sphingolipid 4-Hydroxylation In *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11062-11068.

Gudz, T.I., Tserng, K.Y. und Hoppel, C.L. (1997) Direct Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex III by Cell-Permeable Ceramide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24154-24158.

Haak, D., Gable, K., Beeler, T. und Dunn, T. (1997) Hydroxylation of Saccharomyces cerevisiae ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29704-29710.

Hamburger, D., Egerton, M. und Riezman, H. (1995) Yeast Gaa1p Is Required for Attachment of a Completed GPI Anchor onto Proteins. *J. Cell Biol.*, **129**, 629-639.

Hanada, K., Hara, T. und Nishijima, M. (2000) Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8409-8415.

Hannan, L.A. und Edidin, M. (1996) Traffic, Polarity, and Detergent Solubility of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein after Ldl-Deprivation of MDCK Cells. *J. Cell Biol.*, **133**, 1265-1276.

Hanson, B.A. und Lester, R.L. (1980) The extraction of inositol-containing phospholipids and phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *J. Lipid Res.*, **21**, 309-315.

Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehingel, S., Tschochner, H. und Wieland, F. (1996) Nonclathrin Coat Protein Gamma, a Subunit Of Coatomer, Binds to the Cytoplasmic Dilysine Motif Of Membrane Proteins Of the Early Secretory Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1902-1906.

Hechtberger, P., Zinser, E., Saf, R., Hummel, K., Paltauf, F. und Daum, G. (1994) Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 641-649.

Heidler, S.A. und Radding, J.A. (1995) The *AUR1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2765-2769.

Hiroi, Y., Komuro, I., Chen, R., Hosoda, T., Mizuno, T., Kudoh, S., Georgescu, S.P., Medol, M.E. und Yazaki, Y. (1998) Molecular cloning of human homolog of yeast *GAA1* which is required for attachment of glycosylphosphatidylinositols to proteins. *FEBS Lett.*, **421**, 252-258.

Hirschberg, K., Rodger, J. und Futerman, A.H. (1993) The Long-Chain Sphingoid Base Of Sphingolipids Is Acylated At the Cytosolic Surface Of the Endoplasmic Reticulum In Rat Liver. *Biochem. J.*, **290**, 751-757.

Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem.*, **347**, 166.

Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G. und Stoffel, W. (2000) Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg2+-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 5895-5900.

Horn, W.S., Smith, J.L., Bills, G.F., Raghoobar, S.L., Helms, G.L., Kurtz, M.B., Marrinan, J.A., Frommer, B.R., Thornton, R.A. und Mandala, S.M. (1992) Sphingofungins E and F: novel serinepalmitoyl transferase inhibitors from Paecilomyces variotii. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **45**, 1692-1696.

Horvath, A., Sutterlin, C., Manning-Krieg, U., Movva, N.R. und Riezman, H. (1994) Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J.*, **13**, 3687-3695.

Inoue, N., Ohishi, K., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J. und Kinoshita, T. (1999) Human and mouse GPAA1 (Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1) genes: genomic structures, chromosome loci and the presence of a minor class intron. *Cytogenet. Cell Genet.*, **84**, 199-205.

Jackson, M.R., Nilsson, T. und Peterson, P.A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **9**, 3153-3162.

Jackson, M.R., Nilsson, T. und Peterson, P.A. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **121**, 317-333.

Jenkins, G.M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L. und Hannun, Y. (1997) Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32566-32572.

Jenkins, G.R., Tolleson, W.H., Newkirk, D.K., Roberts, D.W., Rowland, K.L., Saheki, T., Kobayashi, K., Howard, P.C. und Melchior, W.B. (2000) Identification of fumonisin B-1 as an inhibitor of argininosuccinate synthetase using fumonisin affinity chromatography and in vitro kinetic studies. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **14**, 320-328.

Jiang, J.C., Kirchman, P.A., Zagulski, M., Hunt, J. und Jazwinski, S.M. (1998) Homologs of the yeast longevity gene *LAG1* in Caenorhabditis elegans and human. *Genome Res.*, **8**, 1259-1272.

Kanety, H., Hemi, P., Papa, M.Z. und Karasik, A. (1996) Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9895-9897.

Kok, J.W., Babia, T., Klappe, K., Egea, G. und Hoekstra, D. (1998) Ceramide Transport from Endoplasmic Reticulum to Golgi Apparatus Is Not Vesicle-Mediated. *Biochem. J.*, **333**, 779-786.

Krakow, J.L., Hereld, D., Bangs, J.D., Hart, G.W. und Englund, P.T. (1986) Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12147-12153.

Kuebler, E., Dohlman, H.G. und Lisanti, M.P. (1996) Identification of Triton X-100 Insoluble Membrane Domains in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* - Lipid Requirements for Targeting of Heterotrimeric G-Protein Subunits. *J. Biol. Chem.*, **271**, 32975-32980.

Kuehn, M.J., Herrmann, J.M. und Schekman, R. (1998) COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*, **391**, 187-190.

Kuehn, M.J., Schekman, R. und Ljungdahl, P.O. (1996) Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J. Cell Biol.*, **135**, 585-595.

Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Leber, A., Fischer, P., Schneiter, R., Kohlwein, S.D. und Daum, G. (1997) The yeast *mic2* mutant is defective in the formation of mannosyl-diinositolphosphorylceramide. *FEBS Lett.*, **411**, 211-214.

Ledesma, M.D., Simons, K. und Dotti, C.G. (1998) Neuronal polarity: Essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3966-3971.

Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1993) Sphingolipids With Inositol Phosphate-Containing Head Groups. *Adv. Lipid Res.*, **26**, 253-272.

Lester, R.L., Wells, G.B., Oxford, G. und Dickson, R.C. (1993) Mutant Strains Of *Saccharomyces cerevisiae* Lacking Sphingolipids Synthesize Novel Inositol Glycerophospholipids That Mimic Sphingolipid Structures. *J. Biol. Chem.*, **268**, 845-856.

Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. und Cosson, P. (1994) Coatomer Is Essential For Retrieval Of Dilysine-Tagged Proteins to the Endoplasmic Reticulum. *Cell*, **79**, 1199-1207.

Levine, T.P., Wiggins, C.A.R. und Munro, S. (2000) Inositol phosphorylceramide synthase is located in the golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2267-2281.

Lewis, M.J. und Pelham, H.R. (1996) SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **85**, 205-215.

Lindquist, S. und Kim, G. (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5301-5306.

Mandala, S.M., Frommer, B.R., Thornton, R.A., Kurtz, M.B., Young, N.M., Cabello, M.A., Genilloud, O., Liesch, J.M., Smith, J.L. und Horn, W.S. (1994) Inhibition of serine palmitoyl-transferase activity by lipoxamycin. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **47**, 376-379.

Mandala, S.M., Thornton, R.A., Frommer, B.R., Curotto, J.E., Rozdilsky, W., Kurtz, M.B., Giacobbe, R.A., Bills, G.F., Cabello, M.A., Martin, I., Pelaez, F. und Harris, G.H. (1995) The discovery of Australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase from Sporormiella australis. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **48**, 349-356.

Mandala, S.M., Thornton, R.A., Frommer, B.R., Dreikorn, S. und Kurtz, M.B. (1997a) Viridiofungins, novel inhibitors of sphingolipid synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **50**, 339-343.

Mandala, S.M., Thornton, R.A., Rosenbach, M., Milligan, J., Garcia Calvo, M., Bull, H.G. und Kurtz, M.B. (1997b) Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32709-32714.

Mandala, S., Thornton, R., Tu, Z., Kurtz, M.B., Nickels, J., Broach, J., Menzeleev, R. und Spiegel, S. (1998a) Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: A key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 150-155.

Mandala, S.M., Thornton, R.A., Milligan, J., Rosenbach, M., Garcia Calvo, M., Bull, H.G., Harris, G., Abruzzo, G.K., Flattery, A.M., Gill, C.J., Bartizal, K., Dreikorn, S. und Kurtz, M.B. (1998b) Rustmicin, a potent antifungal agent, inhibits sphingolipid synthesis at inositol phosphoceramide synthase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14942-14949.

Mao, C., Kim, S.H., Almenoff, J.S., Rudner, X.L., Kearney, D.M. und Kindman, L.A. (1996) Molecular cloning and characterization of SCaMPER, a sphingolipid Ca-2+ release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1993-1996.

Mao, C., Wadleigh, M., Jenkins, G.M., Hannun, Y.A. und Obeid, L.M. (1997) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28690-28694.

Mao, C., Xu, R., Bielawska, A. und Obeid, L.M. (2000a) Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6876-6884.

Mao, C., Xu, R., Bielawska, A., Szulc, Z.M. und Obeid, L.M. (2000b) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specifity for dihydroceramide. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31369-31378.

Marathe, S., Schissel, S.L., Yellin, M.J., Beatini, N., Mintzer, R., Williams, K.J. und Tabas, I. (1998) Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase - Implication for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**, 4081-4088.

Martin, S.J., Newmeyer, D.D., Mathias, S., Farschon, D.M., Wang, H.G., Reed, J.C., Kolesnick, R.N. und Green, D.R. (1995) Cell-Free Reconstitution of Fas-, Uv Radiation- and Ceramide-Induced Apoptosis. *EMBO J.*, **14**, 5191-5200.

Mathias, S., Dressler, K.A. und Kolesnick, R.N. (1991) Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 10009-10013.

Mathias, S., Pena, L.A. und Kolesnick, R.N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.*, **335**, 465-480.

Mays, R.W., Siemers, K.A., Fritz, B.A., Lowe, A.W., Van Meer, G. und Nelson, W.J. (1995) Hierarchy of mechanisms involved in generating Na-K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **130**, 1105-1115.

McConville, M.J. und Ferguson, M.A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.*, **294**, 305-324.

McCusker, J.H., Perlin, D.S. und Haber, J.E. (1987) Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4082-4088.

Mewes, H.W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer, F. und Zollner, A. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature*, **387**, 7-65.

Michel, C., Van Echten Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E. und Merrill, A.H., Jr. (1997) Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22432-22437.

Mitchell, A.G. und Martin, C.E. (1997) Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome beta-5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome beta-5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28281-28288.

Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T. und Kawasaki, T. (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1-myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **211**, 396-403.

Morell, P. und Radin, N.S. (1970) Specificity in ceramide biosynthesis from long chain bases and various fatty acyl coenzyme A's by brain microsomes. *J. Biol. Chem.*, **245**, 342-350.

Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. und Pfizenmaier, K. (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.*, **14**, 1961-1969.

Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P. und Riezman, H. (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol.*, **148**, 925-930.

Muniz, M. und Riezman, H. (2000) Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.*, **19**, 10-15.

Nagiec, M.M., Wells, G.B., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1993) A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22156-22163.

Nagiec, M.M., Baltisberger, J.A., Wells, G.B., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1994) The *LCB2* gene of *Saccharomyces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7899-7902.

Nagiec, M.M., Nagiec, E.E., Baltisberger, J.A., Wells, G.B., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1997) Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9809-9817.

Nagiec, M.M., Skrzypek, M., Nagiec, E.E., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1998) The *LCB4* (YOR171c) and *LCB5* (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19437-19442.

Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. und Jigami, Y. (1992) *OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J.*, **11**, 2511-2519.

Nickels, J.T. und Broach, J.R. (1996) A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G-1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **10**, 382-394.

Nilsson, T., Jackson, M. und Peterson, P.A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707-718.

Nuoffer, C., Jeno, P., Conzelmann, A. und Riezman, H. (1991) Determinants For Glycophospholipid Anchoring Of the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 Protein to the Plasma Membrane. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 27-37.

Ogg, S.C., Poritz, M.A. und Walter, P. (1992) Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 895-911.

Oh, C.S., Toke, D.A., Mandala, S. und Martin, C.E. (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17376-17384.

Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H. und Kinoshita, T. (2000) Gaa1p and Gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 1523-1533.

Orci, L., Glick, B.S. und Rothman, J.E. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, **46**, 171-184.

Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H. und Rothman, J.E. (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, **90**, 335-349.

Parrou, J.L., Teste, M.A. und Francois, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, **143**, 1891-1900.

Patton, J.L. und Lester, R.L. (1991) The Phosphoinositol Sphingolipids Of *Saccharomyces cerevisiae* Are Highly Localized In the Plasma Membrane. *J. Bacteriol.*, **173**, 3101-3108.

Peraldi, P., Hotamisligil, G.S., Buurman, W.A., White, M.F. und Spiegelman, B.M. (1996) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13018-13022.

Percy, A.K., Carson, M.A., Moore, J.F. und Waechter, C.J. (1984) Control of phosphatidylethanolamine metabolism in yeast: diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase and diacylglycerol cholinephosphotransferase are separate enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **230**, 69-81.

Persson, B. und Argos, P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, **237**, 182-192.

Pinto, W.J., Wells, G.B., Williams, A.C., Anderson, K.A., Teater, E.C. und Lester, R.L. (1986) Characterization Of a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Defective In Inositol Sphingolipid Synthesis. *Fed. Proc.*, **45**, 1826.

Popolo, L. und Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 385-400.

Puoti, A., Desponds, C. und Conzelmann, A. (1991) Biosynthesis Of Mannosylinositolphosphoceramide In *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent On Genes Controlling the Flow Of Secretory Vesicles From the Endoplasmic Reticulum to the Golgi. *J. Cell Biol.*, **113**, 515-526.

Qie, L., Nagiec, M.M., Baltisberger, J.A., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1997) Identification of a *Saccharomyces* gene, *LCB3*, necessary for incorporation of exogenous long chain bases into sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16110-16117.

Quintern, L.E., Schuchman, E.H., Levran, O., Suchi, M., Ferlinz, K., Reinke, H., Sandhoff, K. und Desnick, R.J. (1989) Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *EMBO J.*, **8**, 2469-2473.

Reggiori, F., Canivenc Gansel, E. und Conzelmann, A. (1997) Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 3506-3518.

Reggiori, F. und Conzelmann, A. (1998) Biosynthesis of inositol phosphoceramides and remodeling of glycosylphosphatidylinositol anchors in *Saccharomyces cerevisiae* are mediated by different enzymes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30550-30559.

Rothman, J.E. und Orci, L. (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*, **355**, 409-415.

Rylova, S.N., Kozlov, A.M., Kogtev, L.S., Gaenko, G.P. und Dyatlovitskaya, E.V. (1997) Antiproliferative activity of ceramides isolated from normal human ovary and ovarian tumor. *Biochemistry (Mosc.)*, **62**, 1053-1056.

Saba, J.D., Nara, F., Bielawska, A., Garrett, S. und Hannun, Y.A. (1997) The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26087-26090.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463-5467.

Schimmoeller, F., Singer-Krueger, B., Schroeder, S., Krueger, U., Barlowe, C. und Riezman, H. (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.*, **14**, 1329-1339.

Schneiter, R. (1999) Brave little yeast, please guide us to thebes: sphingolipid function in S. cerevisiae. *Bioessays*, **21**, 1004-1010.

Schönbächler, M., Horvath, A., Fassler, J. und Riezman, H. (1995) The yeast *SPT14* gene is homologous to the human PIG-A gene and is required for GPI anchor synthesis. *EMBO J.*, **14**, 1637-1645.

Schroeder, R., London, E. und Brown, D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12130-12134.

Schroeder-Koehne, S., Letourneur, F. und Riezman, H. (1998) Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport. *J. Cell Sci.*, **111**, 3459-3470.

Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B.G. und Munck, E. (1997) Mossbauer Studies Of Alkane Omega-Hydroxylase - Evidence For a Diiron Cluster In an Integral-Membrane Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 2981-2986.

Shimeno, H., Soeda, S., Sakamoto, M., Kouchi, T., Kowakame, T. und Kihara, T. (1998) Partial Purification and Characterization of Sphingosine N-Acyltransferase (Ceramide Synthase) from Bovine Liver Mitochondrion-Rich Fraction. *Lipids*, **33**, 601-605.

Simon, S.M. und Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **65**, 371-380.

Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D. und Helenius, A. (1995) BiP-Kar2p Serves as a Molecular Chaperone during Carboxypeptidase Y Folding in Yeast. *J. Cell Biol.*, **130**, 41-49.

Sipos, G., Puoti, A. und Conzelmann, A. (1994) Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: Absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.*, **13**, 2789-2796.

Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C. und Conzelmann, A. (1997) Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 3494-3505.

Skryzypek, M., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1513-1520.

Skrzypek, M.S., Nagiec, M.M., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1999) Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, **181**, 1134-1140.

Smaby, J.M., Momsen, M., Kulkarni, V.S. und Brown, R.E. (1996) Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry (Mosc.).*, **35**, 5696-5704.

Smith, S.W. und Lester, R.L. (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3395-3405.

Spiegel, S. und Merrill, A.H., Jr. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*, **10**, 1388-1397.

Sur, I.P., Lobo, Z. und Maitra, P.K. (1994) Analysis of *PFK3,* a gene involved in particulate phosphofructokinase synthesis reveals additional functions of *TPS2* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 199-209.

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C. und Kroemer, G. (1997) The Central Executioner of Apoptosis - Multiple Connections between Protease Activation and Mitochondria in Fas/Apo-1/Cd95- and Ceramide-Induced Apoptosis. *J. Exp. Med.*, **186**, 25-37.

Sütterlin, C., Doering, T.L., Schimmoller, F., Schroder, S. und Riezman, H. (1997) Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J. Cell Sci.*, **110**, 2703-2714.

Suzuki, A., Iwasaki, M., Kato, M. und Wagai, N. (1997) Sequential Operation of Ceramide Synthesis and Ice Cascade in Cpt-11-Initiated Apoptotic Death Signaling. *Exp. Cell Res.*, **233**, 41-47.

Teasdale, R.D. und Jackson, M.R. (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 27-54.

Townsley, F.M. und Pelham, H.R. (1994) The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.*, **64**, 211-216.

van Echten, G. und Sandhoff, K. (1993) Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5341-5344.

Varma, R. und Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394**, 798-801.

Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitzfriedman, A., Fuks, Z. und Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for Ceramide-Initiated Sapk/Jnk Signalling in Stress-Induced Apoptosis. *Nature*, **380**, 75-79.

Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1993) Early Lipid Intermediates In Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchor Assembly Are Synthesized In the Er and Located In the Cytoplasmic Leaflet Of the ER Membrane Bilayer. *J. Cell Biol.*, **121**, 987-996.

Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1994) The GPI Anchor of Cell-Surface Proteins Is Synthesized on the Cytoplasmic Face of the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.*, **127**, 333-341.

Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1995) Soluble constituents of the ER lumen are required for GPI anchoring of a model protein. *EMBO J.*, **14**, 4686-4694.

von Heijne, G. (1992) Membrane proteine structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive inside rule. *J. Mol. Biol.*, **255**, 487-494.

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. und Merrill, A.H., Jr. (1991) Inhibition Of Sphingolipid Biosynthesis By Fumonisins Implications For Diseases Associated With Fusarium-Moniliforme. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14486-14490.

Wells, G.B. und Lester, R.L. (1983) The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long-chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **258**, 10200-10203.

Wells, G.B., Dickson, R.C. und Lester, R.L. (1998) Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via *de Novo* synthesis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7235-7243.

Wu, W.I., McDonough, V.M., Nickels, J.T., Jr., Ko, J., Fischl, A.S., Vales, T.R., Merrill, A.M., Jr. und Carman, G.M. (1995) Regulation of Lipid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Fumonisin B-1. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13171-13178.

Wuestehube, L.J. und Schekman, R.W. (1992) Reconstitution of transport from Endoplasmic Reticulum to Golgi complex using Endoplasmic Reticulum-ernriched membrane fraction from yeast. *Methods Enzymol.*, **219**, 124-136.

Yao, B., Zhang, Y.H., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S. und Kolesnick, R. (1995) Phosphorylation of Raf by Ceramide-Activated Protein Kinase. *Nature*, **378**, 307-310.

Zanolari, B., Friant, S., Funato, K., Sutterlin, C., Stevenson, B.J. und Riezman, H. (2000) Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **19**, 2824-2833.

Zegers, M.M.P. und Hoekstra, D. (1998) Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.*, **336**, 257-269.

Zhao, C., Beeler, T. und Dunn, T. (1994) Suppressors of the Ca-2+-sensitive yeast mutant (*csg2*) identify genes involved in sphingolipid biosynthesis: Cloning and characterization of *SCS1*, a gene required for serine palmitoyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21480-21488.

Zou, J., Katavic, V., Giblin, E.M., Barton, D.L., Mackenzie, S.L., Keller, W.A., Hu, X. und Taylor, D.C. (1997) Modification of seed oil content and acyl composition in the *Brassicaceae* by expression of a yeast *sn*-2 acyltransferase gene. *Plant Cell*, **9**, 909-923.

Zweerink, M.M., Edison, A.M., Wells, G.B., Pinto, W. und Lester, R.L. (1992) Characterization Of a Novel Potent and Specific Inhibitor Of Serine Palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25032-25038.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungen

Verwendete chemische Formeln entsprechen den IUPAC-Konventionen.

[^{14}C]-Ser	L-[U^{14}C]-Serin
[^{3}H]-DHS	D-*erythro*-[4,5-^{3}H]-Dihydrosphingosin
[^{3}H]-Ino	*myo*-[2^{3}H]-Inositol
[^{3}H]-PA	[9,10(n)-^{3}H]-Palmitinsäure
[^{32}P]-P	*ortho*-[^{32}P]-Phosphat
AbA	Aureobasidin A
Ade	Adenin
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C2-Ceramid	Acetylsphinganin
C6-Ceramid	Hexanoylsphinganin
CAPK	Ceramidaktivierte Proteinkinase
CAPP	Ceramidaktivierte Proteinphosphatase
Cer	Ceramid
CerS	Ceramidsynthase
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerol
DHCer	Dihydroceramid
DHS	Dihydrosphingosin
DHS-1-P	Dihydrosphingosin-1-Phosphat
DM	Dodecylmaltosid
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Electron Impact
ER	Endplasmatisches Retikulum
EST	Expressed Sequence Tag
Etn	Ethanolamin
FB1	Fumonisin B1
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GDP-Man	Guanosin-5-Diphospho-D-Mannose
GMP-PNP	5-Guanylylimidodiphosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	*N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-Ethansulfonsäure
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IC_{50}	Inhibierungskonzentration (50 %)
IgG	Immunglobulin G
IL-1β	Interleukin-1β
IPC	Inositolphosphorylceramid
IPCerS	Inositolphosphorylceramidsynthase
IU	International Units
KDHS	3-Ketodihydrosphingosin
Leu	Leucin
$M(IP)_2C$	Mannosyldiinositolphosphorylceramid
mcs	Multiple Cloning Site
min	Minute
MIPC	Mannosylinositolphosphorylceramid
$NADPH/H^+$	Nicotinadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
OD_x	Optische Dichte bei x nm
OG	Octylglycosid
ON	Oligonukleotid
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin

PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PHCer	Phyroceramid
PHS	Phytosphingosin
PI	Phosphatidylinositol
PIPLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
pk	polyklonal
PKCζ	Proteinkinase Cζ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Meerrettichperoxidase
ProtA-S	Protein-A-Sepharose
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SPT	Serinpalmitintransferase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(Ethylenglycolether)$_n$
Trp	Tryptophan
Tween	Polyoxyethylenglykolsorbitolestermonolaureat
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
ÜS	Überstand

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Biosynthese von Ceramid in Hefe 14
Abb. 2.2: Grundgerüst eines Typ-III $M(IP)_2C$ aus Hefe 16
Abb. 2.3: Zusammenfassende Darstellung aller bekannten metabolischen Reaktionswege von Sphingolipiden in *S.cerevisiae* 18
Abb. 2.4: Grundstruktur des GPI-Ankers in Hefe 21
Abb. 2.5: Entstehung und Wirkung von Ceramid als Stresssignal in Säugerzellen 25
Abb. 2.6: EM Aufnahme von Wildtyp- und *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen 30
Abb. 3.1: Liste der Homologen zu *LAG1* aus *S. cerevisiae* 32
Abb. 3.2: Vergleich homologer Sequenzen der *LAG*-Familie 34
Abb. 3.3: Sequenzvergleich des *LAG*-Motives aus verschiedenen Organismen 35
Abb. 3.4: Phylogenetischer Stammbaum der *LAG*-Proteine 36
Abb. 3.5: Hydropathieplot von Lag1p 38
Abb. 3.6: Präparation mikrosomaler Membranen aus STY2.1 38
Abb. 3.7: Proteolytischer Verdau intakter ER-Kompartimente 39
Abb. 3.8: Hypothetische Sekundärstruktur von Lag1p/Dgt1p in der ER-Membran 41
Abb. 3.9: Fähigkeit verschiedener *DGT1*-Mutanten zur Komplementation des *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekts 42
Abb. 3.10: Analyse *in vitro*-generierter COPII-Vesikel 45
Abb. 3.11: Solubilisierungsreihe von Lag1p-Myc im Vergleich integraler Membranproteine 48
Abb. 3.12: Coimmunpräzipitation von Lag1p-Myc und Dgt1p-Flag aus solubilisierten ER-Membranen 49
Abb. 3.13: Analyse der Syntheserate inositolhaltiger Lipide in Abhängigkeit von *LAG1* und *DGT1* 53
Abb. 3.14: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in Wildtyp und *lag1*Δ*dgt1*Δ 55
Abb. 3.15: IPCerS-Aktivität in *lag1*Δ*dgt1*Δ 56
Abb. 3.16: Vergleich unterschiedlich markierter und hydrolysierter Lipidextrakte 58
Abb. 3.17: Inkorporation von exogenem [^{3}H]-DHS in Ceramid ist defekt in *lag1*Δ*dgt1*Δ 61

Abb. 3.18: Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Sphingoidbasen ist unbeeinträchtigt in *lag1*Δ*dgt1*Δ 63
Abb. 3.19: Lipidsynthese in *lag1*Δ*dgt1*Δ ist resistent gegenüber FB1 64
Abb. 3.20: Analyse methylierter Fettsäuren nach saurer Methanolyse kompletter Zellen 66
Abb. 3.21: Auswirkung der Überexpression von *LAG1* und *DGT1* auf die Lipidbiosynthese 68
Abb. 3.22: Lag1p und Dgt1p sind ein essentieller Bestandteil für die CerS-Reaktion *in vitro* 70
Abb. 3.23: Überexpression von YBR183w (*YPC1*) und YPL087w (*YDC1*) supprimiert den *lag1*Δ*dgt1*Δ-Wachstumsdefekt partiell 72
Abb. 3.24: Analyse der Syntheserate inositolhaltiger Lipide in supprimierten *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen 74
Abb. 3.25: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in supprimierten *lag1*Δ*dgt1*Δ-Zellen 76
Abb. 3.26: Der Einbau von exogenen DHS in Ceramid ist abhängig von der Präsenz von *LAG1* und *DGT1* aber unabhängig von Ypc1p und Ydc1p 77
Abb. 3.27: Quantitative Bestimmung der Sphingolipidmengen in *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen 79
Abb. 3.28: Temperaturabhängiges Wachstum vom Wildtyp-, *lag1*Δ*dgt1*Δ- und *lag1*Δ*dgt1*Δ*ypc1*Δ*ydc1*Δ-Zellen 81
Abb. 3.29: Überlebensrate von Hefezellen nach Hitzeschock 82
Abb. 4.1: Die *de novo*-Synthese von Ceramid in Hefe 83
Abb. 4.2: Modell der ceramidvermittelten Sortierung GPI-verankerter Proteine in COPII-Vesikel 90

DANK!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dieter Oesterhelt für meine Adoption als wissenschaftlicher Waise, für stimulierende und tiefgreifende Diskussionen, viel Geduld und vor allem für die Möglichkeit, eigene Ideen zu verwirklichen.

Ein ebenfalls großer Dank geht an Dr. Wolfgang Barz für die Bereitstellung eines überaus faszinierenden Themas, für mannigfache Diskussionen, kreative Kritik, viele Ideen und die Förderung des eigenen wissenschaflichen Denkens.

I would like to say a big THANK YOU to Prof. Howard Riezman and Dr. Béatrice Vallée for a great collaboration on the analysis of this sticky ceramide and for many helpful discussions.

Danke Peter Spiteller für die Hilfe bei der Fettsäureanalytik und Alex Milbradt für eine überaus erfolgreiche Hand bei der Suppressoranalyse.

Vielen Dank dem Fonds der Chemischen Industrie für die Vergabe eines großzügigen Promotionsstipendiums.

Ein herzliches Dankeschön an Prof. Wolfgang Gärtner und Dr. Jörg Tittor für hilfreiche Kritik beim Erstellen dieser Arbeit.

Gedankt sei Eleonore Haack für ihre ständige Hilfsbereitschaft, Christel Weihrauch und Dr. Karin Rodewald für die Hilfe beim Sequenzieren, sowie Uta Schimanko für die "Oligos in letzter Minute".

Dem Labor *überhaupt*: Rita (der gute Geist - hoch die Tassen!), Il Padrone Dr. Francesco Francia (O-Ton: "If you would have done this in Italy, they would kill you or *even* destroy your car!"), Christian (die bessere Hälfte der "Atomic Sisters"), Wolfgang G. (besser bekannt als "Der Reisende"), Benjamin (esistgeradezuunglaublichwielangederkerlredetohnepunktundkommaundohneluftzuholenunddasobwohlmanihngarnichtsgefragthatsaynomore!)
- ohne Euch wär's nur halb so kurzweilig gewesen!

Vielen Dank Euch, Alex, Bianca, Boris, Christian, Doug, Eva, Florian, Frank, Hans, Hüseyn, Irene, Lars, Mathias, Matz, Mauseschwänzchen, Michael, Miriam, Peter, Sylvia, Tanja, Walter, für die tolle Atmosphäre in der Abteilung, (b)laue Stunden zu vorgerückter Zeit, unzählige Diskussion und das geduldige Ertragen eines ewig quasselnden Lipidologen!

Mein liebevoller Dank gilt meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe,

und besonders Dir, liebe Frau, für Deinen Sonnenschein an düsteren Tagen, Dein Lachen an hellen Tagen, und jede Deiner Umarmungen!
Dieses Buch ist für Dich! * ** *

Lebenslauf

Stefan Schorling
Dom-Pedro-Str. 6
80637 München

geboren am 30.10.1969 in Hannover
verheiratet seit 01.10.1994 mit Christine Schorling geb. Zierer

Schulbildung

1976 - 1980	Weißensee-Grundschule München
1980 - 1989	Gymnasium Unterhaching
24.06.1989	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1989 - 1991	Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung bei der Lebenshilfe Miesbach e.V.

Studium

1992 - 1997	Diplom-Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1996 - 1997	Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. A. Böck: "Verbreitung von Selenoproteinen in Prokaryonten"
28.11.1997	Diplom in Biologie

Dissertation

seit 1998	Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. D. Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried "Ceramidsynthese in Saccharomyces cerevisiae"
1998 - 2000	Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie

München, den 13. Januar 2001