

Für meine Eltern

**Biophysikalische und molekulargenetische Untersuchung der
Dinukleotid-Bindung von Gal80 aus
Saccharomyces cerevisiae und *Kluyveromyces lactis***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Frau **Doreen Schmidt**
geboren am 23. Juni 1980 in Wolfen (Sachsen - Anhalt)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karin D. Breunig
2. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
3. Dr. habil. Karsten Melcher

Verteidigung:

04. Oktober 2010

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungen und Symbole	VI
1. Einleitung	1
1.1 Galaktose-Metabolisierung in Hefe	2
1.2 Die Transkriptionsaktivierung der <i>GAL</i> -Gene.....	4
1.3 Die Regulation des Transkriptionsaktivators Gal4	5
2. Gegenstand der Arbeit	8
3. Material und Methoden	10
3.1 Verwendete Materialien	10
3.1.1 Chemikalien.....	10
3.1.2 Plasmide	11
3.1.3 Oligonukleotide.....	12
3.1.4 Synthetisches Peptid	12
3.1.5 Enzyme, Standards und Zusätze der Molekularbiologie	12
3.1.6 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	13
3.1.7 <i>Kluyveromyces lactis</i> -Stämme	13
3.1.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	14
3.1.9 Nährmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen	15
3.1.9.1 Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	15
3.1.9.2 Nährmedien für die Kultivierung von Hefe.....	15
3.2 Molekularbiologische Methoden	16
3.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
3.2.2 Isolation von chromosomaler-DNA aus Hefe.....	16
3.2.3 Amplifikation von DNA-Sequenzen	16
3.2.4 Restriktionsverdau von DNA	16
3.2.5 Fällung von DNA mit Polyethylenglycol	17
3.2.6 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA	17
3.2.7 Agarosegelelektrophorese	17
3.2.8 Ortsgerichtete Mutagenese	17
3.2.9 Sequenzierung.....	18
3.2.9.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA	18
3.2.9.2 Sequenzierung von chromosomaler-DNA	18
3.2.10 Stammhaltung von Mikroorganismen	19
3.2.11 Herstellung chemokompetenter Hefezellen	19
3.2.12 Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA.....	20
3.2.12.1 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	20
3.2.12.2 Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA	20

3.3 Molekulargenetische Methoden	21
3.3.1 <i>gene replacement</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.3.1.1 <i>knockout</i> von <i>GAL80</i> , <i>GAL1</i> , <i>GAL3</i> und <i>SIN4</i> in <i>S. cerevisiae</i>	21
3.3.1.2 Konstruktion eines $P_{ScGAL80}$ - <i>KIGAL80</i> -Fusionsgens in <i>S. cerevisiae</i>	22
3.3.2 Plasmid-Integration in <i>Kluyveromyces lactis</i>	23
3.3.3 X-Gal-Plattentest zur phänotypischen Charakterisierung von Hefe.....	23
3.4 Proteinchemische Methoden	24
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	24
3.4.3 Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität.....	24
3.4.3.1 Galaktokinase-Assay.....	24
3.4.3.2 Einschritt-Inhibierungsexperiment.....	25
3.4.3.3 Zweisritt-Inhibierungsexperiment.....	25
3.4.4 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	25
3.4.4.1 Kultivierung von Hefe für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	25
3.4.4.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefe.....	26
3.4.4.3 β -Galaktosidase-Assay.....	26
3.4.5 Herstellung und Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	26
3.4.5.1 Herstellung von Gal80.....	26
3.4.5.2 Zellaufschluss und Reinigung von Gal80.....	26
3.4.5.3 Herstellung und Reinigung von KIGal1.....	27
3.4.6 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen.....	27
3.5 Biophysikalische Methoden	28
3.5.1 Analytische Ultrazentrifugation.....	28
3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	28
3.5.3 <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektroskopie.....	29
3.5.4 CD-Spektroskopie.....	29
3.5.4.1 Nah-UV-Vis CD-Spektroskopie.....	30
3.5.4.2 Fern-UV CD-Spektroskopie.....	30
3.5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie.....	30
3.5.6 Analytische Gelfiltration.....	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Herstellung und Reinigung von Gal80	32
4.2 Charakterisierung der Gal80-Dinukleotid-Interaktion <i>in vitro</i>	34
4.2.1 Thermodynamische Untersuchungen der Gal80-Dinukleotid-Interaktion.....	34
4.2.1.1 Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i> besitzen unterschiedliche Affinitäten für Dinukleotide.....	34
4.2.1.2 Punktmutationen beeinflussen die Dinukleotid-Bindung von Gal80.....	40
4.2.2 Strukturelle Untersuchungen der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion.....	43
4.2.2.1 Konformationsänderung von NADP durch Interaktion mit KIGal80.....	43
4.2.2.2 Dinukleotid-Bindung hat keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur von KIGal80.....	44
4.2.2.3 Punktmutation in KIGal80 hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung.....	47
4.2.3 Kinetische Untersuchungen der Gal80-Dinukleotid-Interaktion.....	48
4.2.3.1 Dinukleotid-Bindung induziert Konformationsänderung in KIGal80.....	48
4.2.4 Einfluss des Liganden auf die Gal4/Gal1-Gal80-Interaktion.....	50
4.2.4.1 Unterschiedlicher Einfluss von AD-22 auf die Gal80-NAD(P)-Interaktion.....	50
4.2.4.2 Dinukleotid-Bindung beeinträchtigt die KIGal80-AD-22-Interaktion.....	51

4.3 Untersuchung der Gal80-Dinukleotid-Interaktion <i>in vivo</i>	54
4.3.1 Konstruktion von <i>K. lactis</i> KIGAL80-Mutanten-Stämmen	54
4.3.2 LAC-Expression in <i>S. cerevisiae</i> ist vom ScGAL80-Allel abhängig	56
4.3.3 LAC-Expression bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist ScGAL3-abhängig	58
4.3.4 Mutanten Scgal80-H99L und Scgal80-G24V induzierten langsamer als ScGAL80 ⁺	60
4.3.5 Scgal80-H99L- und Scgal80-G24V-Mutante zeigten keine Induktion mit Laktose	62
4.3.6 Gal80-G24V aus <i>K. lactis</i> ersetzt nicht ScGal80-G24V in <i>S. cerevisiae</i>	63
5. Diskussion	67
5.1 Der Ligand beeinflusst die Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine	67
5.2 Die Liganden-Bindung von Gal80 beeinflusst die Gal4-Aktivität.....	70
5.3 Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i> binden Dinukleotide mit unterschiedlicher Affinität	72
5.4 Modellvorstellung zur Modulierung des GAL-Transkriptionsschalters durch den Liganden	74
5.5 Metabolite beeinflussen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren	76
6. Zusammenfassung	77
7. Anhang	79
8. Literatur	81

Abbildungsverzeichnis

Schema 1. Metabolismus von Galaktose und Melibiose bzw. Laktose in <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	3
Schema 2. Vereinfachte Darstellung des <i>GAL</i> -Transkriptionsschalters in <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	7
Schema 3. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	9
Schema 4. Hypothetisches Modell zur Regulation des <i>GAL</i> -Transkriptionsschalters durch den Liganden.	75
Abbildung 1. Elutionsprofile der präparativen Gelfiltration von Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	33
Abbildung 2. Analyse der Elutionsfraktionen der präparativen Gelfiltration von Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i>	33
Abbildung 3. Lokalisation der Tryptophanreste in Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	35
Abbildung 4. Fluoreszenzspektren von Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	35
Abbildung 5. Tryptophanfluoreszenz von NATA und KIGal80 in Abhängigkeit von NADP.	37
Abbildung 6. Tryptophanfluoreszenz von ScGal80 in Abhängigkeit von NADP.	37
Abbildung 7. Isothermale Titrationskalorimetrie von KIGal80 mit Dinukleotiden.	39
Abbildung 8. Tryptophanfluoreszenz von KIGal80 und der KIGal80-Varianten in Abhängigkeit von NAD.	41
Abbildung 9. Lokalisation der Mutationen in Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	42
Abbildung 10. Nah-UV-Vis CD-Spektren von KIGal80 titriert mit NADP.	44
Abbildung 11. Analytische Gelfiltration von KIGal80.	45
Abbildung 12. Fern-UV CD-Spektren von KIGal80 titriert mit NADP.	46
Abbildung 13. Fern-UV CD-Spektren der KIGal80-Varianten.	46
Abbildung 14. Analytische Ultrazentrifugation von KIGal80 und KIGal80-W31G titriert mit NADP.	48
Abbildung 15. <i>Stopped-flow</i> -Kinetik der NADP-Bindung von KIGal80.	49
Abbildung 16. Möglicher <i>Induced-fit</i> der NAD-Bindung von Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i>	50
Abbildung 17. Partielles <i>alignment</i> der C-terminalen Aminosäuren von Gal4 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>	51
Abbildung 18. Einfluss von NADP auf die Interaktion von KIGal80 mit AD-22.	53
Abbildung 19. <i>KIGAL1</i> -abhängige <i>LAC</i> -Expression bei niedriger Glukosekonzentration in <i>K. lactis</i>	54
Abbildung 20. Vom Integrationsort abhängiger Phänotyp der <i>Klgal80-G24V</i> -Mutante in <i>K. lactis</i>	55
Abbildung 21. <i>ScGAL80</i> -abhängige <i>LAC</i> -Expression bei niedrigen Glukosekonzentrationen in <i>S. cerevisiae</i>	57
Abbildung 22. <i>GAL3</i> -Abhängigkeit der <i>LAC</i> -Expression bei 0,2% Glukose in <i>S. cerevisiae</i>	59
Abbildung 23. Einfluss der <i>ScGAL80</i> -Allele auf die Kinetik der <i>LAC4</i> -Induktion in <i>S. cerevisiae</i>	61
Abbildung 24. Laktoseverwertung in <i>S. cerevisiae</i> ist vom <i>ScGAL80</i> -Allel abhängig.	62
Abbildung 25. Einfluss der <i>KIGAL80</i> -Allele auf die <i>LAC</i> -Expression in <i>S. cerevisiae</i>	64
Abbildung 26. Ko-Kristallstruktur von ScGal80 und KIGal80 und einem Gal4-Peptid.	69
Abbildung 27. Lokalisation von Mutationen in ScGal80, die die ScGal3- und ScGal4-Bindung beeinträchtigen. .	71
Anhang A1. Fluoreszenzspektren der KIGal80-Varianten.	79
Anhang A2. Plot der Endwerte der <i>stopped-flow</i> -Kinetiken von KIGal80 mit NADP.	79
Anhang A3. Wachstum der Hefekulturen für die <i>LAC</i> -Expression in Flüssigkultur.	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Dissoziationskonstanten der Gal80-Dinukleotid-Interaktion.	36
Tabelle 2. Thermodynamische Parameter der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion.	40
Tabelle 3. Dissoziationskonstanten der NAD-Bindung der KIGal80-Varianten.	42
Tabelle 4. Dissoziationskonstanten der Gal80-Dinukleotid-Interaktion in Anwesenheit von AD-22.	51
Tabelle 5. Einfluss von NADP und AD-22 auf die KIGal80-vermittelte Inhibierung von KIGal1.	52
Tabelle A1. Übersicht über den Einfluss der Mutationen in <i>GAL80</i> auf die <i>LAC</i> -Expression.	80

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

AA	Aminosäuren
AD	Aktivierungsdomäne
AE	arbiträre Einheit
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
cal	Kalorie
CD	Zirkulardichroismus
<i>cps</i>	<i>counts per second</i>
Da	Dalton
deg	<i>degree</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Glc	Glukose
(His) ₆ -tag	6fache Histidin-Markierung
J	Joule
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
min	Minute
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NATA	N-Acetyl-Tryptophanamid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rcf</i>	relative Zentrifugationsbeschleunigung
RT	Raumtemperatur
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
sec	Sekunde
TAD	Transaktivierungsdomäne
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
vis	<i>visible</i>
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YEP	<i>yeast extract peptone</i>

Symbole

F	Fluoreszenzsignal in Anwesenheit des Quenchers
F_0	Fluoreszenzsignal in Abwesenheit des Quenchers
ΔG^0	freie Enthalpie (Gibbs-Energie)
ΔH^0	Enthalpie
k	Geschwindigkeitskonstante
K_B	Bindungskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
λ	Wellenlänge
N	stöchiometrischer Faktor
ΔP	Heizleistung
ΔS^0	Entropie
Θ_{molar}	molare Elliptizität
V_e	Elutionsvolumen

Für die Bezeichnung von Genen und Allelen werden, im Gegensatz zur Schreibweise für das Genprodukt (Protein bzw. Enzym), drei kursiv geschriebene Buchstaben verwendet. Ist das Wildtypallel gemeint, ist dies durch ein nachgestelltes „+“ im Text gekennzeichnet.

Kennzeichnung von Proteinen

Gal80	bezeichnet Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>
gal80-G24V	bezeichnet Gal80-G24V aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>
Gal4	bezeichnet Gal4 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>
Gal1	bezeichnet Gal1 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>
ScGal80	Gal80 aus <i>S. cerevisiae</i>
NHScGal80	ScGal80 mit einem N-terminalen Histidin- <i>tag</i>
ScGal80-H99L	ScGal80-Variante, in der das Histidin in Position 99 durch Leucin substituiert ist
ScGal80-G24V	ScGal80-Variante, in der das Glycin in Position 24 durch Valin substituiert ist
ScGal80-W31G	ScGal80-Variante, in der das Tryptophan in Position 31 durch Glycin substituiert ist
ScGal4	Gal4 aus <i>S. cerevisiae</i>
ScGal3	Gal3 aus <i>S. cerevisiae</i>
ScGal1	Gal1 aus <i>S. cerevisiae</i>
KIGal80	Gal80 aus <i>K. lactis</i>
KIGal80-G24V	KIGal80-Variante, in der das Glycin in Position 24 durch Valin substituiert ist
NHKIGal80	KIGal80 mit einem N-terminalen Histidin- <i>tag</i>
IHKIGal80	KIGal80 mit einem internen Histidin- <i>tag</i>
NHKIGal80-H99L	NHKIGal80-Variante, in der das Histidin in Position 99 durch Leucin substituiert ist
NHKIGal80-G24V	NHKIGal80-Variante, in der das Glycin in Position 24 durch Valin substituiert ist
NHKIGal80-W31G	NHKIGal80-Variante, in der das Tryptophan in Position 31 durch Glycin substituiert ist

NHKIGal80-E122G	NHKIGal80-Variante, in der das Glutamat in Position 122 durch Glycin substituiert ist
NHKIGal80-D88A	NHKIGal80-Variante, in der das Aspartat in Position 88 durch Alanin substituiert ist
KIGal4	Gal4 aus <i>K. lactis</i>
KIGal1	Gal1 aus <i>K. lactis</i>

Kennzeichnung von Genen und Allelen

<i>GAL80</i>	kodiert Gal80
<i>gal80-G24V</i>	kodiert Gal80-G24V
<i>ScGAL80</i>	kodiert ScGal80
<i>Scgal80-H99L</i>	kodiert ScGal80-H99L
<i>Scgal80-G24V</i>	kodiert ScGal80-G24V
<i>Scgal80-W31G</i>	kodiert ScGal80-W31G
<i>Scgal80</i> Δ	Deletion von <i>ScGAL80</i>
<i>ScGAL3</i>	kodiert ScGal3
<i>Scgal3</i> Δ	Deletion von <i>ScGAL3</i>
<i>gal3</i> Δ	Deletion von <i>GAL3</i>
<i>ScGAL1</i>	kodiert ScGal1
<i>Scgal1</i> Δ	Deletion von <i>ScGAL1</i>
<i>gal1</i> Δ	Deletion von <i>GAL1</i>
<i>sin4</i> Δ	Deletion von <i>SIN4</i>
<i>KIGAL80</i>	kodiert KIGal80
<i>Klgal80-G24V</i>	kodiert KIGal80-G24V
<i>Klgal80</i> Δ	Deletion von <i>KIGAL80</i>
<i>P_{ScGAL80}-KIGAL80</i>	kodiert KIGal80, das vom natürlichen <i>ScGAL80</i> -Promotor exprimiert wird
<i>P_{ScGAL80}-Klgal80-G24V</i>	kodiert KIGal80-G24V, das vom natürlichen <i>ScGAL80</i> -Promotor exprimiert wird
<i>KIGAL1</i>	kodiert KIGal1
<i>Klgal1</i> Δ	Deletion von <i>KIGAL1</i>

Bestimmte in der biochemischen Fachliteratur allgemein verwendete Abkürzungen und Symbole, wenn hier nicht auftretend, werden im Text erklärt. Aminosäuren werden im Drei- bzw. Einbuchstaben-Kode angegeben. Nukleinsäuren werden im Einbuchstaben-Kode angegeben. Im Text verwendete Anglizismen und lateinische Begriffe sind kursiv kenntlich gemacht. Teilweise sind diese Begriffe Bestandteil der deutschen Fachsprache in zusammengesetzten Wörtern und sind in diesen ebenfalls durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

1. Einleitung

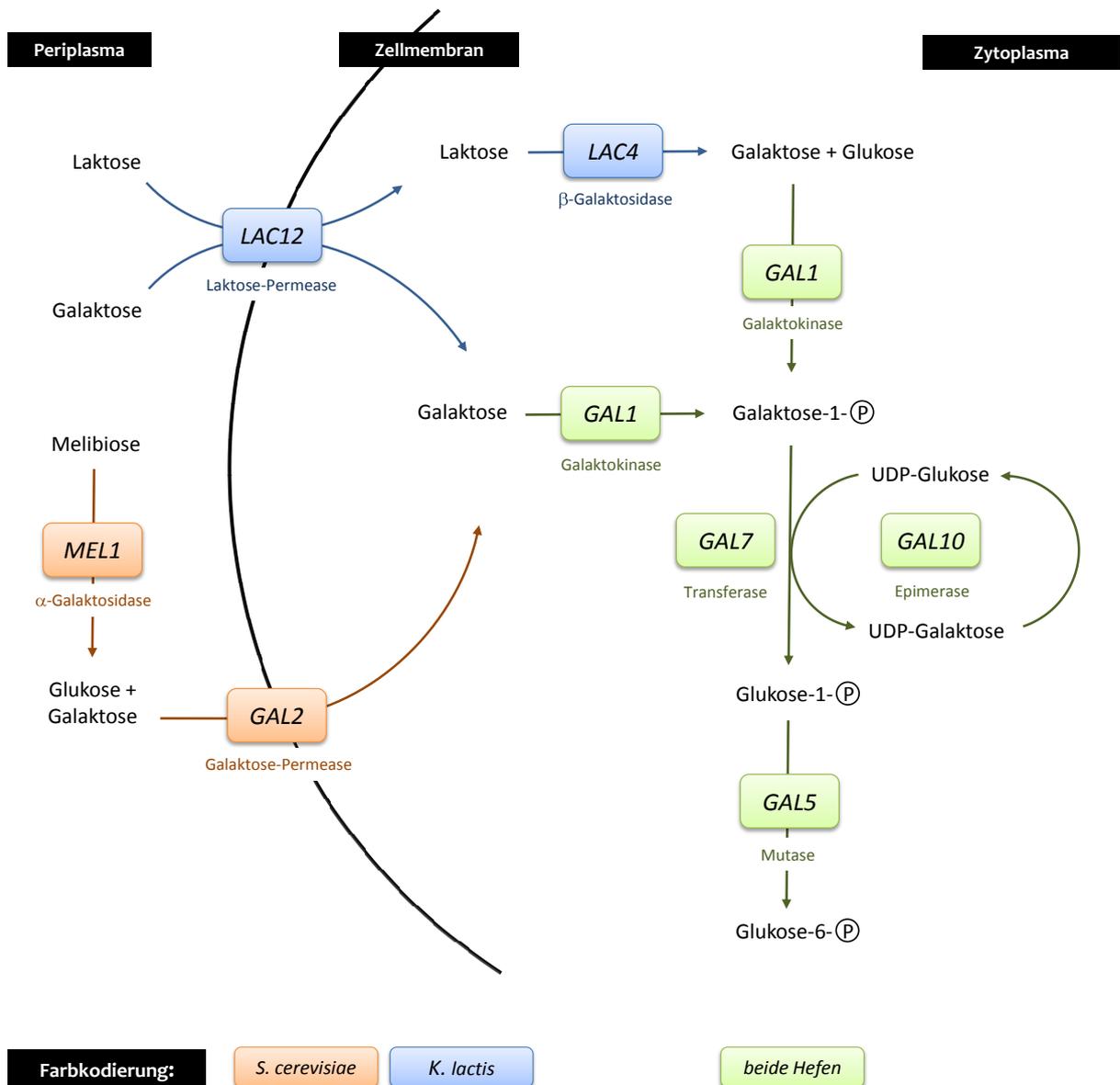
Einer der weltweit am besten charakterisierten einzelligen Mikroorganismen ist das Bakterium *Escherichia coli*. 1919 von Theodor Escherich entdeckt und nach ihm benannt. Die Steuerung der bakteriellen Genexpression dient vor allem zur Anpassung der einzelnen Zelle an Veränderungen des Nährstoffangebots in der Umgebung. Mit der Änderung der Genaktivität werden Zellwachstum und Zellteilung gesteuert. Als Energiequelle kann *E. coli* verschiedene Zucker (u.a. Glukose und Laktose) sowie Aminosäuren nutzen. In diesem Zusammenhang ist das *lac*-Operon eines der am besten untersuchten Systeme der Genregulation in *E. coli* (zusammenfassende Literatur: Lodish *et al.* (2001), (1)). Das *lac*-Operon kodiert Enzyme und Proteine, die für die Aufnahme und Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose notwendig sind. Steht Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, ist die Transkription des *lac*-Operons durch den *lac*-Repressor, der an die DNA-Sequenz des *lac*-Operators bindet, blockiert. Die Expression des *lac*-Operons wird durch Laktose selbst induziert. Laktose bindet an den *lac*-Repressor, wodurch eine Konformationsänderung desselben induziert wird und dieser vom *lac*-Operator dissoziiert. Für die RNA-Polymerase ist der Promotor dadurch frei zugänglich und die Transkription des *lac*-Operons findet statt. Stehen der Zelle Glukose und Laktose gleichzeitig als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, wird die Transkriptionsstärke des *lac*-Operons durch den cAMP-CAP-Komplex reguliert. Bei niedrigen Konzentrationen an Glukose wird das Signalmolekül cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) durch Adenylcyclasen verstärkt synthetisiert. Das Signalmolekül cAMP bindet an das Katabolit-Aktivator-Protein (CAP), wodurch ein cAMP-CAP-Komplex gebildet wird, der an die CAP-Bindungsstelle im *lac*-Operator bindet und die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase stimuliert. Bei einer hohen Glukosekonzentration ist dagegen die Transkription des *lac*-Operons nicht so effizient, da wenig cAMP synthetisiert wird.

In einzelligen Eukaryoten, wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*, sind ebenfalls zahlreiche Gene vorhanden, die aufgrund von sich ändernden Umweltbedingungen, u.a. dem Nährstoffangebot, zur Aufrechterhaltung eines stabilen inneren Milieus (Homöostase) reguliert werden. Glukose stellt ein zentrales Molekül im Kohlenhydratstoffwechsel dar und kann ohne die Induktion neuer Enzyme und Proteine metabolisiert werden. Daher ist Glukose nicht nur für *E. coli* sondern auch für *S. cerevisiae* und *K. lactis*, die vor anderen Zuckern bevorzugte Kohlenstoffquelle. Alternative Kohlenstoffquellen, die von beiden Hefen genutzt werden können, sind Galaktose und Sucrose. Melibiose und Raffinose können nur von *S. cerevisiae* und Laktose nur von *K. lactis* als weitere alternative Kohlenstoffquellen metabolisiert werden. Die Regulation der Transkription der für die Verwertung von Galaktose und Melibiose bzw. Laktose notwendigen Gene unterliegt in *S. cerevisiae* und *K. lactis* einem ähnlichen Mechanismus. Das *GAL/MEL*-Regulon in *S. cerevisiae* und *GAL/LAC*-Regulon in *K. lactis* sind in der Vergangenheit sehr detailliert studiert worden und stellen ein Modellsystem für die Genregulation in Eukaryoten, die komplexer als die Regulation des *lac*-Operons in *E. coli* ist, dar. Trotz der intensiven Untersuchungen der letzten Jahrzehnte sind die beiden Systeme zur Regulation der *GAL/MEL*- und *GAL/LAC*-Gene in *S. cerevisiae* und *K. lactis* noch nicht völlig verstanden.

1.1 Galaktose-Metabolisierung in Hefe

Die *GAL/MEL*-Gene in *S. cerevisiae* und *GAL/LAC*-Gene in *K. lactis* kodieren enzymatische und regulatorische Proteine, die für die Aufnahme und Verwertung von Galaktose sowie Melibiose und Laktose notwendig sind. Die Regulation der Transkription der *GAL/MEL*- bzw. *GAL/LAC*-Gene erfolgt in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Ist ausreichend Glukose im Medium vorhanden, sind die *GAL/MEL*- bzw. *GAL/LAC*-Gene fast vollständig reprimiert (Glukose-Repression, reprimierter Zustand). In Glukose-reprimierten Zellen ist die Expression des Transkriptionsaktivators Gal4 stark reduziert (2; 3). In *K. lactis* ist die Glukose-Repression nicht so stark ausgeprägt wie in *S. cerevisiae*. Bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, zum Beispiel Glycerin, Ethanol und Laktat, ist nur eine geringe oder keine *GAL*-Expression nachweisbar (nicht-induzierter Zustand, nicht-reprimierter Zustand). Die Induktion der *GAL*-Gene erfolgt durch Galaktose, dem induzierenden Zucker (induzierter Zustand). Die Transkription der *GAL*-Gene in Abhängigkeit von Galaktose wird durch die Interaktion der *GAL*-regulatorischen Proteine, dem Aktivator Gal4, dem Repressor Gal80 und ScGal3 bzw. KlGal1 reguliert.

Die Verwertung von Melibiose in *S. cerevisiae* und Laktose in *K. lactis* ist durch die basale Transkription der *MEL*- und *LAC*-Gene möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die basale Transkription von Gal4 abhängig ist und auf einer nicht vollständigen Repression durch Gal80 beruht (4). Die basale Expression ist in *K. lactis* im Vergleich zu *S. cerevisiae* auf Grund des positiven *feedback-loops* der Autoregulation von KlGal4 erhöht (5). In *S. cerevisiae* wird Melibiose (Disaccharid bestehend aus Glukose und Galaktose, die (1-6 α)-glykosidisch verknüpft sind) im Periplasma durch die α -Galaktosidase, die von *MEL1* kodiert wird, in Glukose und Galaktose gespalten, die dann in die Zelle transportiert werden. In *K. lactis* wird Laktose (Disaccharid bestehend aus Glukose und Galaktose, die (1-4 β)-glykosidisch verknüpft sind) durch die Laktose-Permease, die von *LAC12* kodiert wird, in die Zelle transportiert und im Zytoplasma durch die β -Galaktosidase, die von *LAC4* kodiert wird, in Glukose und Galaktose gespalten. Galaktose wird in *K. lactis* durch die Laktose-Permease und in *S. cerevisiae* durch die Galaktose-Permease, die von *GAL2* kodiert wird, in das Zytoplasma transportiert. Galaktose wird im *Leloir*-Stoffwechselweg in Glukose-1-Phosphat umgewandelt (Schema 1) (zusammenfassende Literatur: Frey, P. A. (1996), (6)). Zunächst wird Galaktose durch die Galaktokinase, die von *GAL1* kodiert wird, unter ATP-Verbrauch in Galaktose-1-Phosphat umgewandelt. Anschließend wird Galaktose-1-Phosphat durch Übertragung einer Uridylgruppe von UDP-Glukose in Glukose-1-Phosphat umgewandelt. Bei dieser von der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, die von *GAL7* kodiert wird, katalysierten Reaktion, entsteht UDP-Galaktose. UDP-Galaktose kann durch die UDP-Galaktose-4-Epimerase, die von *GAL10* kodiert wird, in UDP-Glukose umgewandelt werden. Alternativ kann bei Bedarf UDP-Galaktose in die Synthese von komplexen Polysacchariden und Glykoproteinen eingehen. Glukose-1-Phosphat wird durch die Glukosephosphat-Mutase in Glukose-6-Phosphat, das in die Glykolyse eingehen kann, isomerisiert.



Schema 1. **Metabolismus von Galaktose und Melibiose bzw. Laktose in *S. cerevisiae* und *K. lactis*.** Galaktose wird im *Leloir*-Stoffwechselweg in Glukose-1-Phosphat umgewandelt, das nach Umlagerung der Phosphorylgruppe als Glukose-6-Phosphat in die Glykolyse eingehen kann. Die Enzyme des *Leloir*-Stoffwechselwegs werden von *GAL1*, *GAL7* und *GAL10* kodiert.

1.2 Die Transkriptionsaktivierung der GAL-Gene

Die Galaktose-Induktion der *GAL/MEL*-Gene in *S. cerevisiae* bzw. *GAL/LAC*-Gene in *K. lactis* ist von dem Transkriptionsaktivator Gal4, einem $Zn(II)_2Csy_6$ -Protein abhängig. Gal4 bindet als Dimer an die UAS-Elemente (*upstream activating sequence*, Konsensussequenz 5'-CGGN₁₁CCG-3') in der Promotorregion der *GAL/MEL*-Gene bzw. *GAL/LAC*-Gene (7–9). Die Anzahl der UAS-Elemente und deren relativen Affinitäten für Gal4 variieren innerhalb der *GAL/MEL*- bzw. *GAL/LAC*-Gene und führt zu einer unterschiedlich starken Aktivierung (10). ScGal4 besitzt kein UAS-Element im eigenen Promotor und wird konstitutiv exprimiert (10). KlGal4 besitzt dagegen ein schwaches UAS-Element im Promotor, wodurch eine Autoregulation von KlGal4 erfolgt, die zu einer etwas höheren Konzentration von KlGal4 im Vergleich zu ScGal4 führt (5). Die Aktivierung der Transkription erfolgt mit Hilfe der C-terminalen sauren Transaktivierungsdomäne von Gal4 (besteht vorwiegend aus sauren Aminosäuren). ScGal4 und KlGal4 können die Transkription der *GAL*-Gene der jeweils anderen Hefe aktivieren (11; 12). Für ScGal4 konnte durch die Deletion der Transaktivierungsdomäne gezeigt werden, dass auch ein interner Bereich in ScGal4 zur Transkriptionsaktivierung fähig ist (13). Eine biologische Relevanz der internen Aktivierungsdomäne ist noch nicht gezeigt. Die Induktion ist in *K. lactis* viel stärker ausgeprägt als in *S. cerevisiae* (zusammenfassende Literatur: Rubio-Teixeira, M. (2005), Lohr *et al.* (1995), (10; 14)).

Es wurde gezeigt, dass die Transaktivierungsdomäne von Gal4 mit Komponenten von SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase-Komplex), Mediator und Swi/Snf-Komplex, ein Chromatin-Restrukturierungskomplex, interagieren kann (15–18). Anhand von Untersuchungen am *ScGAL1-ScGAL10*-Promotor, der vier UAS-Elemente enthält, konnte ein Rekrutierungsmodell für die Transkriptionsaktivierung der *GAL*-Gene erstellt werden (19). Nach diesem Modell wird durch die Transaktivierungsdomäne von ScGal4 zuerst SAGA, dann der Mediator und schließlich die Polymerase II (zusammen mit für die Transkriptionsinitiation notwendigen Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIE, TFIIIF und TFIIH) rekrutiert. Anschließend wird der Swi/Snf-Komplex gebunden. Nukleosomen verhindern die Transkription durch Blockierung des Zugangs der Transkriptionsmaschinerie zur Promotorregion des Zielgens oder durch Hinderung der Bindung des Transkriptionsaktivators. Die enzymatische Komponente des Swi/Snf-Komplexes ist die Swi/Snf2-ATPase, die durch DNA stimuliert wird und durch Hydrolyse die DNA-Histon-Verbindungen löst und dadurch Nukleosomen verschieben kann. Der Swi/Snf-Komplex führt zu einer schnelleren Transkriptionsaktivierung, ist aber für die generelle Transkriptionsaktivierung der *GAL*-Gene nicht erforderlich (20; 21). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Swi/Snf-Komplexes lediglich für die Aktivierung von *ScGAL1* bei stärker kondensiertem Chromatin während der Mitose notwendig ist (22). Für die Transkriptionsaktivierung von anderen Genen (z. B. *SUC2*, *HO*, *PHO8*) in *S. cerevisiae* sind ebenfalls Rekrutierungsmodelle aufgestellt worden (zusammenfassende Literatur: Biddick *et al.* (2009), (19)). Für diese Gene ist der Swi/Snf-Komplex für die Bindung der Transkriptionsmaschinerie erforderlich.

1.3 Die Regulation des Transkriptionsaktivators Gal4

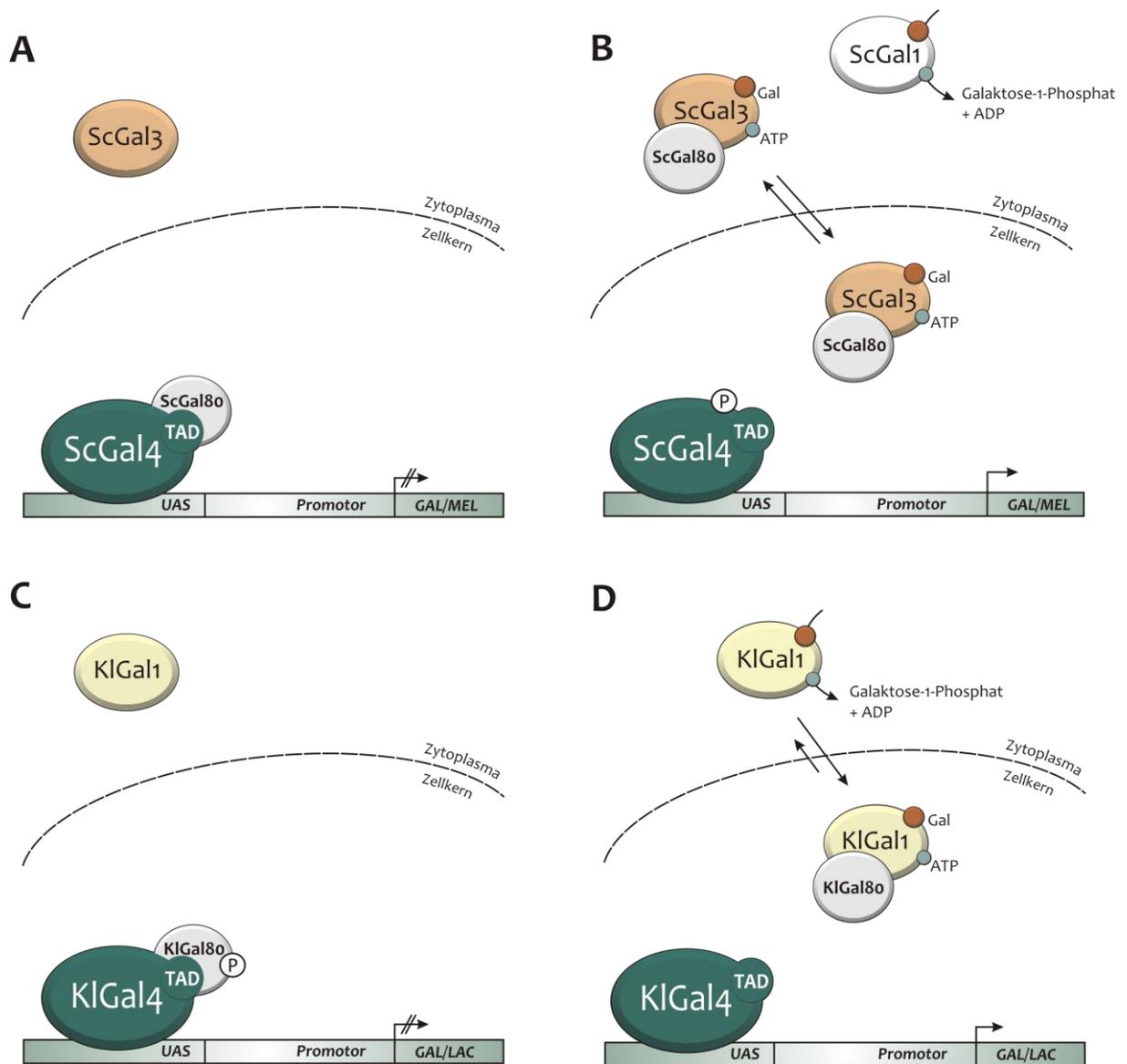
Für die Aktivierung der Transkription der *GAL*-Gene ist es erforderlich, dass die Transaktivierungsdomäne von Gal4 frei ist. Bei nicht-induzierenden Bedingungen wird Gal4 von dem Repressor Gal80 inhibiert (Schema 2). Beide Gal80 (ScGal80 und KIGal80) binden einen Bereich der Transaktivierungsdomäne von Gal4, der zwischen den homologen Gal4 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* konserviert ist (23–26). ScGal80 und KIGal80 sind ebenfalls stark konserviert und weisen eine Gesamtsequenzidentität von 60% und zwei Bereiche mit über 80% Sequenzidentität auf (Schema 3) (29). ScGal80 und KIGal80 können jeweils das andere Gal4 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* inhibieren (25; 27). Die Deletion von *GAL80* sowie bestimmte Mutationen in der Transaktivierungsdomäne von Gal4 führen zu einer konstitutiven Transkriptionsaktivierung der *GAL*-Gene (24; 26; 28–30). Dass die Aktivität von Gal4 durch die Maskierung der Transaktivierungsdomäne reguliert wird, stimmt mit dem Befund überein, dass Gal80 die Interaktion der Transaktivierungsdomäne von Gal4 mit SAGA und dem NuA4-HAT-Komplex verhindert (31). Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* sind zur Dimer- und Tetramerisierung fähig und inhibieren durch Dimer-Dimer-Interaktion Gal4 (4; 33).

In Abhängigkeit von Galaktose wird die Inhibierung von Gal4 durch die Bindung von ScGal3 bzw. KIGal1 an Gal80 aufgehoben (Schema 2) (34; 35). Das regulatorische Protein ScGal3 ist ein Paralog der Galaktokinase ScGal1 und konnte durch den Austausch zweier Aminosäuren in eine Galaktokinase, welche eine Deletion von *ScGAL3* und *ScGAL1* *in vivo* komplementiert, umgewandelt werden (36). *ScGAL3* und *ScGAL1* sind durch Genduplikation des gesamten Genoms von *S. cerevisiae* vor mehr als 100 Millionen Jahren hervorgegangen (37). *ScGAL1* besitzt vier UAS-Elemente und *ScGAL3* ein UAS-Element im Promotor. *ScGAL1* wird im Vergleich zu *ScGAL3* unter nicht-induzierenden Bedingungen viel stärker reprimiert und im Zuge der Galaktose-Induktion stärker exprimiert (10; 14). In *K. lactis* ist die regulatorische und enzymatische Funktion in KIGal1 vereinigt (35). Die Bindung von KIGal80 an KIGal1 führt zur Inhibierung der enzymatischen Funktion von KIGal1, was eine stärkere Induktion von *KIGAL1* gegenüber *KIGAL80* erfordert (33). Die Aufhebung der Inhibierung erfordert die Bindung von Galaktose und ATP an ScGal3 bzw. KIGal1 (27; 38; 39). *ScGAL1*, *ScGAL3* und *KIGAL1* weisen eine Sequenzidentität von über 80% auf. Die Deletion von *ScGAL3* führt in *S. cerevisiae* zu einer um mehrere Tage verzögerten Induktion der *GAL*-Gene, die durch *KIGAL1* und Überexpression von *ScGAL1* supprimiert wird (34; 35). ScGal1 kann nur eingeschränkt die regulatorische Funktion von ScGal3 ersetzen, was auf einer niedrigeren basalen Expression von *ScGAL1* und wahrscheinlich auf einer schwächeren Bindung von ScGal1 an ScGal80 im Vergleich zu ScGal3 beruht (40; 41). In *K. lactis* konnte eine Deletion von *KIGAL1* weder durch *ScGAL3* noch durch *ScGAL1* supprimiert werden und war erst nach Austausch von *KIGAL80* durch *ScGAL80* möglich (27). KIGal80 wird, im Gegensatz zu ScGal80, reguliert phosphoryliert (42). Im nicht-induzierten Zustand wurde eine hyperphosphorylierte und im induzierten Zustand eine von KIGal1-abhängige hypophosphorylierte Form von KIGal80 nachgewiesen (42). Befunde in unserem Labor legen einen Einfluss des Phosphorylierungsstatus von KIGal80 auf die Bindungsstärke mit KIGal1 nahe.

Im Gegensatz zu KIGal4 wird ScGal4 an vier verschiedenen Serinresten phosphoryliert (43–45). Die Phosphorylierung des Serinrestes 699 ist für eine effiziente Induktion im *ScGAL80*⁺-Hintergrund erforderlich. Es wird angenommen, dass die bei der Galaktose-Induktion auftretende Phosphorylierung des Serinrestes 699 die Inhibierung von ScGal4 durch ScGal80 herabsetzt (46).

Für die Aufhebung der Inhibierung von ScGal4 durch ScGal3 wurden zwei Modelle vorgeschlagen. Im allosterischen Modell führt die Bindung von ScGal3 an ScGal80 zu einer Konformationsänderung von ScGal80, was zur Freisetzung der Transaktivierungsdomäne von ScGal4 führt. Bei diesem Modell bleibt ScGal80 an ScGal4 gebunden, wodurch ein trimärer Komplex gebildet wird. Das allosterische Modell wird u.a. dadurch gestützt, dass aus induzierten Zellen gereinigtes ScGal4 mit ScGal80 assoziiert ist (43). Später zeigten Sil *et al.* (1999), dass *in vitro* der ScGal4-ScGal80-Komplex durch ScGal3, insbesondere in Anwesenheit von Galaktose und ATP, destabilisiert wird aber nicht vollständig dissoziiert vorliegt (47). Desweiteren ist *in vitro* die Bildung eines trimären Komplexes von Platt und Reece 1998 gezeigt worden (41). Im Dissoziationsmodell wird davon ausgegangen, dass ScGal80 durch Interaktion mit ScGal3 vollständig von ScGal4 dissoziiert. Dieses Modell wird von den Befunden gestützt, dass ScGal80 und ScGal3 zwischen Zellkern und Zytoplasma shutteln können und der ScGal3-ScGal80-Komplex in beiden Kompartimenten gefunden wird (48; 49). Desweiteren hat der Ausschluss von ScGal3 aus dem Zellkern durch Verankerung in der Plasmamembran keinen Einfluss auf die erfolgreiche Induktion (50). Das Dissoziationsmodell schließt aber die Bildung eines trimären Komplexes nicht aus.

Für KlGal80 ist ausschließlich eine nukleäre und für KlGal1 eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation gezeigt (33). Der KlGal1-KlGal80-Komplex ist aber nur im Nukleus nachgewiesen worden (33). Untersuchungen des *GAL*-Transkriptionsschalters in *K. lactis* favorisieren das Dissoziationsmodell. Dies schließt aber die Bildung eines trimären Komplexes nicht aus.



Schema 2. Vereinfachte Darstellung des GAL-Transkriptionsschalters in *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

S. cerevisiae: **A.** Unter nicht-induzierenden Bedingungen wird ScGal4 (bindet an die UAS-Elemente im Promotor der GAL/MEL-Gene) durch den Repressor ScGal80, der die Transaktivierungsdomäne (TAD) von ScGal4 bindet, inhibiert. **B.** In Abhängigkeit von Galaktose (Gal) und ATP (induzierende Bedingungen) wird die Inhibition von ScGal4 durch die Bindung von ScGal3 an ScGal80 aufgehoben. Im Zuge der Galaktose-Induktion wird ScGal4 phosphoryliert, wodurch die Inhibition von ScGal4 durch ScGal80 herabgesetzt wird. Die freigesetzte TAD von ScGal4 rekrutiert Faktoren der Transkriptionsmaschinerie und aktiviert die Transkription. Die Galaktokinase ScGal1 phosphoryliert Galaktose, die im *Leioir*-Stoffwechselweg in Glukose-6-Phosphat umgewandelt wird.

K. lactis: **C.** Unter nicht-induzierenden Bedingungen wird KIGal4 (bindet an die UAS-Elemente im Promotor der GAL/LAC-Gene) durch den Repressor KIGal80, der die Transaktivierungsdomäne (TAD) von KIGal4 bindet, inhibiert. KIGal80 liegt in hyperphosphorylierter Form vor, wodurch die Bindung an KIGal1 herabgesetzt wird. **D.** In Abhängigkeit von Galaktose (Gal) und ATP (induzierende Bedingungen) wird die Inhibition von KIGal4 durch die Bindung von KIGal1 an KIGal80 aufgehoben. Im Zuge der Galaktose-Induktion wird KIGal80 KIGal1-abhängig dephosphoryliert. Die freigesetzte TAD von KIGal4 rekrutiert Faktoren der Transkriptionsmaschinerie und aktiviert die Transkription. Die Galaktokinase KIGal1 phosphoryliert Galaktose, die im *Leioir*-Stoffwechselweg in Glukose-6-Phosphat umgewandelt wird. Die Bindung von KIGal1 an KIGal80 führt zu Inhibition der Galaktokinase-Aktivität von KIGal1.

2. Gegenstand der Arbeit

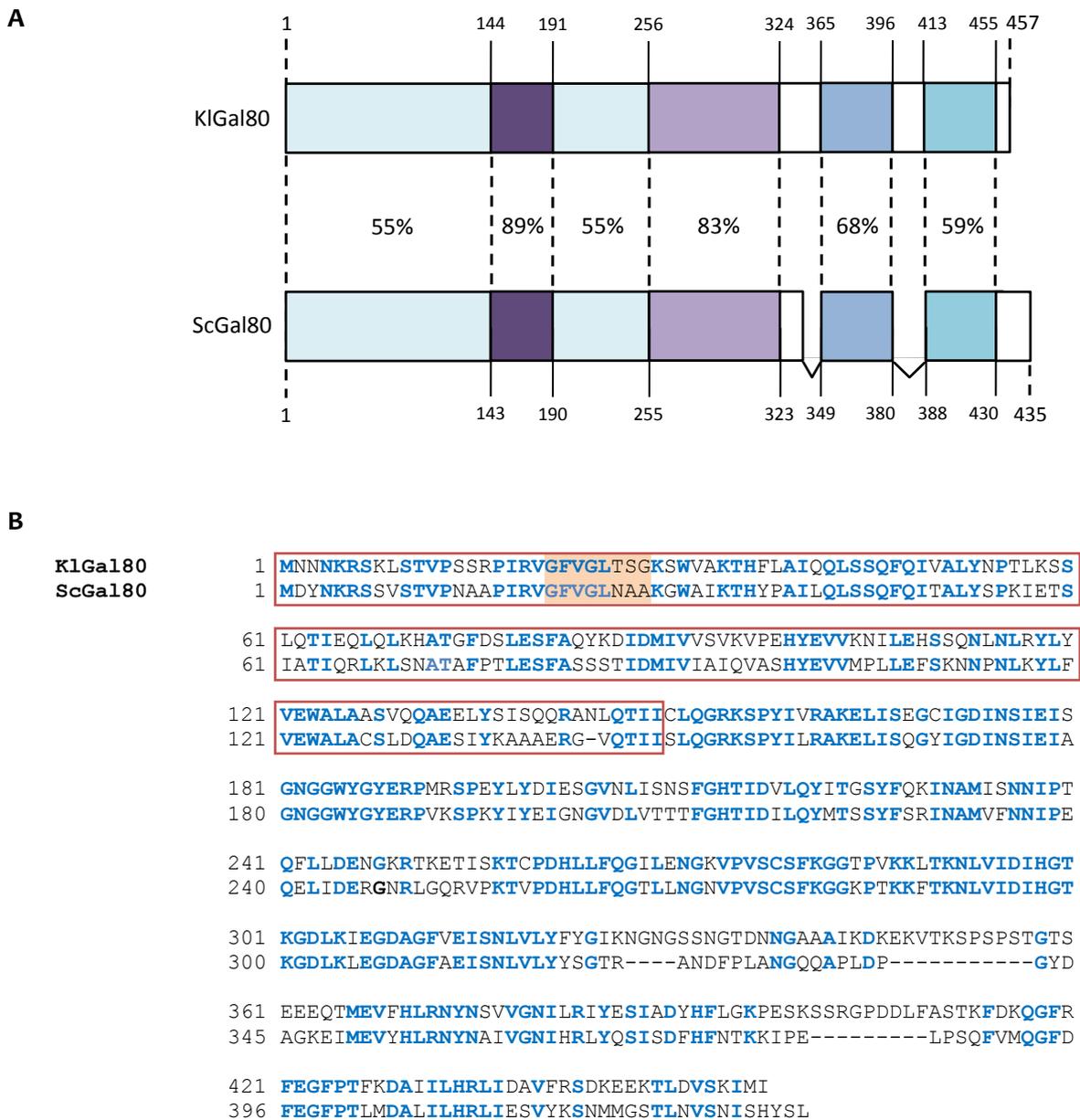
Pyridin-Nukleotide sind seit Anfang des 20. Jahrhunderts als essentielle Redoxpotentiale der Zelle bekannt und dienen als Ko-Enzyme und Ko-Substrate in Stoffwechsel- und Biosynthesewegen. In den letzten Jahren sind zudem neue Funktionen von NAD(P) als Substrate für kovalente Proteinmodifikationen und als Vorläufer für *second messenger* aus der Literatur bekannt geworden (51).

Es gibt immer mehr Beispiele, die den Einfluss von NAD(P) auf die Organisation der Chromatinstruktur und die Transkription zeigen. In *Drosophila melanogaster* bindet PARP-1, eine Poly(ADP-ribose) Polymerase, an Nukleosomen und ist durch die NAD-abhängige Auto(ADP-ribosyl)ierung an der Bildung von transkriptionell inaktivem und aktivem Chromatin beteiligt (52). Der Tumor-Suppressor p53 wird durch die NAD-abhängige Deacetylierung von hSir2 (*silent information regulator*) inaktiviert und bindet selbst NAD, was die Bindung von p53 an die DNA inhibiert (53; 54). Das zu hSir2 homologe Sir2 in Hefe ist an der transkriptionellen Stillung der Paarungstyp Loci *HML* und *HMR* und von telomerständigen Genen beteiligt, indem es Histone deacetyliert, was zu einer stärkeren Kondensation der DNA und zur Inhibierung der Transkription führt (55). Der Ko-Repressor CtBP1 (C-terminale Bindeprotein 1) wird ebenfalls durch den NAD:NADH Spiegel in der Zelle reguliert. Durch die Bindung von NADH dimerisiert CtBP und bindet an die Histonacetyltransferase p300, wodurch diese inhibiert wird (56).

Die Bindung von Mono- und Dinukleotiden im Protein erfolgt durch die sogenannte Rossmann-Falte, die 1973 von Michael G. Rossmann als Dinukleotid-Bindemotif erstmals beschrieben wurde (57; 58). Die Rossmann-Falte besteht aus einer Abfolge von drei β -Faltblättern und zwei α -Helices, die das Mononukleotid-Bindemotif darstellt. Das Dinukleotid-Bindemotif besteht aus zwei Mononukleotid-Bindemotifen und enthält eine Konsensussequenz für die Bindung des Pyrophosphats von Dinukleotiden (59; 60). Für die homologen Gal80 aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* wurden aus der Aminosäuresequenz und anhand von Sekundärstruktur-Analysen solch eine Rossmann-Falte vorausgesagt. Beide Gal80 weisen im Dinukleotid-Bindemotif keine klassische Konsensussequenz der Pyrophosphat-Bindeschleife auf, GXGXX(G/A), sondern eine leicht veränderte Sequenz (GFVGLNAA für ScGal80, GFVGLTSG für KIGal80) auf (Schema 3). Dies brachte die Frage auf, ob ScGal80 und KIGal80 Dinukleotide binden können und eine Regulation des GAL-Transkriptionsschalters durch den Liganden in *S. cerevisiae* und *K. lactis* erfolgt.

Es wurden folgende Aufgaben formuliert:

1. Nachweis und Charakterisierung der Dinukleotid-Bindung von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.
2. Untersuchung des Einflusses der Dinukleotid-Bindung von Gal80 auf die Interaktion mit Gal4 und Gal3 bzw. Gal1.
3. Untersuchungen des Einflusses der Dinukleotid-Bindung auf die Regulation des GAL-Transkriptionsschalters in *S. cerevisiae* und *K. lactis*.
4. Untersuchung des Einflusses der *KIGAL80*-Allele auf die Regulation des GAL-Transkriptionsschalters in *S. cerevisiae*.



Schema 3. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

A. Schematische Darstellung des *alignments* der Aminosäuresequenzen von KIGal80 und ScGal80 in Anlehnung an Zenke *et al.* (1993), (29). Der Anteil an identischen Aminosäuren ist in Prozent angegeben. In Weiß gekennzeichnete Blöcke weisen keine signifikante Ähnlichkeit auf. **B.** *Alignment* der Aminosäuresequenzen von KIGal80 und ScGal80. Identische Aminosäuren sind blau hervorgehoben. Aminosäuren der Rossmann-Falte sind rot eingerahmt. Orange hinterlegt ist die Sequenz für die Bindung des Pyrophosphats von Dinukleotiden. Das *alignment* wurde mit Hilfe des EXPASY SIM - *alignment tool for protein sequences* (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>) erstellt.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von höchster Reinheit. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen für das proteinchemische und biophysikalische Arbeiten wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Puffer für die Reinigung von Proteinen sowie für spektroskopische Messungen wurden sterilfiltriert und entgast. Puffer und Lösungen für das mikrobiologische und molekulargenetische Arbeiten wurden mit einfach destilliertem Wasser hergestellt und durch Sterilfiltration oder Autoklavieren (10 min bei 121°C) sterilisiert. Der pH-Wert wurde bei einer Temperatur von 25°C eingestellt.

Chemikalie	Hersteller/Anbieter
N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (30%ig) (37,5:1)	Carl-Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Carl-Roth, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
L-Aminosäuren	Carl-Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl-Roth, Karlsruhe
Ammonium-peroxo- <i>di</i> -sulfat (APS)	Carl-Roth, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl-Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Carl-Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl-Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl-Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Carl-Roth, Karlsruhe
5-Fluoro Orotic Acid (5-FOA)	ForMedium, UK
Fruktose-1,6-bisphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Galaktose	ForMedium, UK
D(+)-Glukose	Carl-Roth, Karlsruhe
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl-Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl-Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl-Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
α-Laktose	Carl-Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl-Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl-Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl-Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (NaCitrat)	Carl-Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl-Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller/Anbieter
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl-Roth, Karlsruhe
Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotide (NAD, NADH, NADP, NADPH)	AppliChem, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) (25:24:1)	Carl-Roth, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglycol 4.000 (PEG 4.000)	Carl-Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 6.000 (PEG 6.000)	AppliChem, Darmstadt
Protaminsulfat	Merck, Darmstadt
D(+)-Raffinose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Carl-Roth, Karlsruhe
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Carl-Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Carl-Roth, Karlsruhe
Trypton	Serva, Heidelberg
Tween 20	Carl-Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
YNB w/o AA (<i>yeast nitrogen base without amino acids</i>)	Difco, USA

3.1.2 Plasmide

Die zur Amplifikation von auxotrophen Markergenen für das *gene replacement* in *S. cerevisiae* verwendeten YDp-Vektoren (*yeast disruption plasmids*) sind nachfolgend zusammengefasst (61). Bei den Vektoren handelt es sich um pUC9 Ω -Derivate (62). Die Selektion der YDp-Vektoren in *E. coli* erfolgte durch die vom β -Lactamase-Gen vermittelte Ampicillinresistenz.

YDp-Vektor	auxotrophes Markergen	Herkunft
YDp-KI-U	<i>KIURA3</i>	(62)
YDp-KI-L	<i>KILEU2</i>	(62)
YDp-Sp-H	<i>SpHIS5</i>	(62)

Für die Plasmidintegration in *K. lactis* verwendeten *KIGAL80*-Plasmide sind nachfolgend dargestellt. Das pIG80-G24V-Plasmid wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) synthetisiert (3.2.8).

Integrations-plasmid	<i>KIGAL80</i> -Allel	auxotrophes Markergen	Herkunft
pIG80	<i>KIGAL80</i> ⁺	<i>ScURA3</i>	Zenke, F. 1995
pIG80-G24V	<i>KlGal80-G24V</i>	<i>ScURA3</i>	diese Arbeit

Die Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgte von pET-Vektoren (Novagen (Merck), Darmstadt) durch einen mit Laktose induzierbaren T7-Promotor. Die Selektion der pET-Vektoren in *E. coli* erfolgte durch die vom β -Lactamase Gen vermittelte Ampicillinresistenz.

pET-Vektor	rekombinantes Protein	Herkunft
pETIHG80	KIGal80 mit internen (His) ₆ -tag (IHKIGal80)	(33)
pETNHG80	KIGal80 mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHKIGal80)	Kapp, L.
pETNHG80-G24V	KIGal80-G24V mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHKIGal80-G24V)	(63)
pETNHG80-W31G	KIGal80-W31G mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHKIGal80-W31G)	(63)
pETNHG80-H99L	KIGal80-H99L mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHKIGal80-H99L)	(63)
pETNHG1	KIGal1 mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHKIGal1)	(33)
pETNHScG80	ScGal80 mit N-terminalen (His) ₆ -tag (NHScGal80)	Anders, A., 2005

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden nach Angaben des Herstellers in einfach destilliertem Wasser gelöst, so dass eine Endkonzentration von $100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ vorlag. Für das Arbeiten mit Oligonukleotiden wurden Verdünnungen einer Endkonzentration von $2 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ hergestellt. Die Lösungen der Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert.

3.1.4 Synthetisches Peptid

Von Herrn Dr. Frank Bordusa (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)) wurde ein synthetisches Peptid mit der Sequenz der 22 C-terminalen Aminosäuren der Transaktivierungsdomäne (TAD) von Gal4 aus *K. lactis* (AD-22, TQQLFNTTMDVVYNYIFDNDE) zur Verfügung gestellt. Das Peptid wurde durch Festphasenpeptid-Synthese mit der *Fmoc*-Strategie synthetisiert. Für proteinchemische Messungen wurde das KIGal4-Peptid in 20% DMF gelöst und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Konzentration wurde mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.

3.1.5 Enzyme, Standards und Zusätze der Molekularbiologie

Restriktionsenzyme, Ribonuklease A (RNase A), *Pfu*-DNA-Polymerase (rekombinant) sowie Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) wurden von Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen. Pyruvat-Kinase (PK), Laktat-Dehydrogenase (LDH) und ATP wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. *Taq*-DNA-Polymerase (FastStart PCR-Master) wurde von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Es wurde eine 5mM Lösung der dNTPs, eine 100 mM Lösung ATP und für das Arbeiten mit RNase A eine $1 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Lösung in einfach destilliertem Wasser hergestellt und bei -20°C gelagert.

Als *carrier*-DNA, zur Steigerung der Transformationseffizienz von Hefe, wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim) ssDNA (*single stranded salmon testes DNA*) bezogen. Es wurde eine $2 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Lösung der *carrier*-DNA in einfach destilliertem Wasser angefertigt und bei -20°C gelagert.

Als Standard wurde der *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* für die Agarosegelelektrophorese und der *PAGE Ruler Prestained Protein Ladder* für die SDS-Gelelektrophorese von Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet.

3.1.6 *Escherichia coli*-Stämme

Zur Herstellung von Proteinen diente der *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS-Stamm. Es handelt sich um ein BL21 Derivat, der chromosomal für die T7-RNA-Polymerase (DE3) kodiert. Zusätzlich sind in diesem Stamm T7-Lysozym (pLysS) und t-RNA-Gene, was die Herstellung eukaryotischer Proteine begünstigen kann, plasmidkodiert. Die Selektion des Plasmids in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS wird durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen vermittelt. Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* DH5 α -Stamm verwendet.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F' Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) supE44 thi-1 gyrA relA1 λ ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
Rosetta (DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen (Merck), Darmstadt

3.1.7 *Kluyveromyces lactis*-Stämme

Die konstruierten und verwendeten *K. lactis*-Stämme sind bis auf die angegebenen Loci isogen zum JA6 (α ade1-600 adeT-600 trp1-11 ura3-12 LAC9-2) (64). Zur Disruption und Integration von Genen in *K. lactis* wurde *URA3* von *S. cerevisiae* verwendet. Die Konstruktion der JA6/D801R pIG80-Stämme ist unter 3.3.2 beschrieben.

<i>K. lactis</i> -Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
JA6	KIGAL80 ⁺	(64)
JA6/D801R	gal80- Δ 1::ura3	(29)
JA6/D1R	gal1 Δ ::ura3	(65)
JA6/D801R pIG80-8	gal80- Δ 1::ura3 KIGAL80 ⁺	diese Arbeit
JA6/D801R pIG80-36	gal80- Δ 1::ura3 KIGAL80 ⁺	diese Arbeit
JA6/D801R pIG80-G24V-5	gal80- Δ 1::ura3 Klgal80-G24V	diese Arbeit
JA6/D801R pIG80-G24V-31	gal80- Δ 1::ura3 Klgal80-G24V	diese Arbeit
JA6/D801R pIG80-G24V-32	gal80- Δ 1::ura3 Klgal80-G24V	diese Arbeit

3.1.8 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Die konstruierten und verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind bis auf die angegebenen Loci isogen zum FI4 *ScGAL80*⁺-Stamm (*MAT α ura3-52 leu2- Δ 1 trp1- Δ 63 his3- Δ 200 GAL2 KILAC4+LAC12+TRP+*). Der Ausgangsstamm von FI4 *ScGAL80*⁺ war FY1679-06C (EUROSCARF) in dessen *TRP1*-Locus der *LAC4-LAC12*-Locus aus *K. lactis* mit Hilfe eines integrativen Plasmids integriert wurde (66). Für das *gene replacement* in *S. cerevisiae* wurde *URA3* und *LEU2* aus *K. lactis* und *HIS5* aus *Schizosaccharomyces pombe* verwendet.

<i>S. cerevisiae</i>-Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
FI4 <i>ScGAL80</i> ⁺	<i>ScGAL80</i> ⁺	(66)
FI4 <i>Scgal80Δ</i>	<i>gal80Δ::URA3</i>	diese Arbeit
FI4 <i>Scgal80-G24V</i>	<i>gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-G24V</i>	Langhammer, R., 2006
FI4 <i>Scgal80-W31G</i>	<i>gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-W31G</i>	Langhammer, R., 2006
FI4 <i>Scgal80-H99L</i>	<i>gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-H99L</i>	Langhammer, R., 2006
FI4 <i>gal3Δ ScGAL80</i> ⁺	<i>gal3Δ::HIS5 ScGAL80</i> ⁺	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ ScGAL80</i> ⁺	<i>sin4Δ::HIS5 ScGAL80</i> ⁺	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ Scgal80Δ</i>	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::URA3</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ Scgal80-G24V</i>	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-G24V</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ Scgal80-W31G</i>	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-W31G</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ Scgal80-H99L</i>	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-H99L</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ ScGAL80</i> ⁺	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 ScGAL80</i> ⁺	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ Scgal80-G24V</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-G24V</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ Scgal80-W31G</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-W31G</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ Scgal80-H99L</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-H99L</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ gal1Δ ScGAL80</i> ⁺	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal1Δ::LEU2 ScGAL80</i> ⁺	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ gal1Δ Scgal80-G24V</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal1Δ::LEU2 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-G24V</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ gal1Δ Scgal80-W31G</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal1Δ::LEU2 gal80Δ::ura3Δ::Scgal80-W31G</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ gal3Δ gal1Δ Scgal80-H99L</i>	<i>sin4Δ::URA3 gal3Δ::HIS5 gal1Δ::LEU2 gal80Δ::ura3Δ::gal80-H99L</i>	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ P_{ScGAL80}-KIGAL80</i> ⁺	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::P_{ScGAL80}-KIGAL80</i> ⁺	diese Arbeit
FI4 <i>sin4Δ P_{ScGAL80}-Klgal80-G24V</i>	<i>sin4Δ::HIS5 gal80Δ::ura3Δ::P_{ScGAL80}-Klgal80-G24V</i>	diese Arbeit

3.1.9 Nährmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen

Alle Nährmedien wurden mit einfach destilliertem Wasser hergestellt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nährplatten enthielten 2% Agar-Agar.

3.1.9.1 Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde Luria-Bertani (LB)-Medium, bestehend aus 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v), Hefeextrakt und 0,5% (w/v) NaCl, verwendet. Zur rekombinanten Proteinherstellung wurde das LB-Medium mit 0,2 M KH_2PO_4 und 1,5% (v/v) Laktose als Induktor supplementiert. Für die Selektion von Plasmid-haltigen *E. coli*-Zellen wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Konzentration an Ampicillin betrug zur Selektion von YDp-Vektoren $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ und zur Selektion von pET-Vektoren $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Die Konzentration an Chloramphenicol für die Kultivierung von *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS betrug $35 \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.1.9.2 Nährmedien für die Kultivierung von Hefe

Für die Kultivierung von Hefe wurde Vollmedium (YEP), bestehend aus 2% (w/v) Pepton und 1% Hefeextrakt, oder supplementiertes Minimalmedium verwendet. Das Minimalmedium, bestehend aus 0,67% (w/v) YNB w/o AA, wurde mit einem L-Aminosäuren-Mix (14 mg l^{-1} Adenosin, 18 mg l^{-1} Tyrosin, je 48 mg l^{-1} Uracil, Histidin, Tryptophan, Arginin, Methionin, 60 mg l^{-1} Phenylalanin, je 36 mg l^{-1} Leucin, Isoleucin, Lysin, Valin, Threonin) supplementiert, wobei zur Selektion auf auxotrophe Marker die entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt wurde. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium verschiedene Zucker zugesetzt. Hierfür wurden 20%ige (w/v)-Lösungen von Glukose, Galaktose, Raffinose und Laktose angefertigt. Die Laktose-Lösung wurde steril filtriert. Alle anderen Zucker-Lösungen und die Aminosäure-Lösungen wurden für 10 min bei 121°C autoklaviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2 Isolation von chromosomaler-DNA aus Hefe

Zur Isolation von chromosomaler-DNA wurden Hefezellen einer 5 ml Übernachtskultur für 5 min bei 1.500 *rcf* in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm), 200 µl Aufschlusspuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 1% Triton X-100, pH 8,0) sowie 200 µl kaltem PCI bei 4°C für 3-4 min in einem Multi-Pulse Vortexer (VWR Multi Tube Vortexer (230 V), Darmstadt) bei maximaler Leistung. Die Extraktion der chromosomalen-DNA erfolgte durch Zugabe von 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). Nach kurzem Vortexen und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 16.000 *rcf* wurde der Überstand in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und die chromosomale-DNA durch Zugabe von 800 µl 96%igen Ethanol für 5 min bei 16.000 *rcf* (Zentrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg) gefällt. Anschließend wurde die chromosomale-DNA in 200 µl einfach destilliertem Wasser gelöst. Nach einem einstündigen RNase A-Verdau (Endkonzentration RNase A 0,05 µg µl⁻¹) bei 37°C, wurde die chromosomale-DNA nach Zugabe von 20 µl 4M Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl 96%igen Ethanol durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und nach Zentrifugation für 5 min bei 16.000 *rcf* erneut gefällt. Die chromosomale-DNA wurde zur weiteren Verwendung in einfach destilliertem Wasser gelöst. Alle Fällungs- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

3.2.3 Amplifikation von DNA-Sequenzen

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Analytik erfolgte unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase. Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Klonierung von Genen sowie für das *gene replacement* in Hefe wurde *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. PCR-Ansätze und PCR-Programme wurden entsprechend der spezifischen Anforderungen der eingesetzten Enzyme sowie der Herstellerangaben vorgenommen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Mastercycler der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Analytische PCR-Ansätze umfassten 20 µl Volumen und präparative PCR-Ansätze 100 µl Volumen.

3.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und chromosomaler-DNA wurde mit Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde der Restriktionsverdau der DNA mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (3.2.7) kontrolliert.

3.2.5 Fällung von DNA mit Polyethylenglycol

Zur Konzentrierung von DNA sowie zum Entfernen von nicht-inkorporierten Nukleotiden, kleinen DNA-Fragmenten und Primern aus Restriktions- bzw. PCR-Ansätzen wurde eine Fällung mit Polyethylenglycol (PEG) 6.000 durchgeführt (67). Die Fällung erfolgte mit 10 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 18% (v/v) PEG 6.000, pH 8.0 bei RT. Nach Inkubation für 30 min wurde der Fällungsansatz für 10 min bei 16.000 *rcf* (Zentrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 125 µl 70%igen Ethanol überschichtet und nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 16.000 *rcf* in 20 µl einfach destilliertem Wasser gelöst.

3.2.6 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Größenbestimmung und Abschätzung von DNA-Konzentrationen erfolgte anhand eines DNA-Standards im Agarosegel. Eine genaue Bestimmung der Konzentration an Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte spektroskopisch bei 260 nm mit dem Nano-Photometer der Firma Implen (München).

3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse wurden 0,8%ige (w/v) TAE-Agarosegele, welche Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25 µg µl⁻¹) enthielten, verwendet. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (6fach: 15% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Orange G) versetzt und die DNA nach der Größe bei 80-100 V in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) elektrophoretisch in einem PerfectBlue Gelsystem der Firma PEQLAB Biotechnologie (Erlangen) aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im durchscheinenden UV-Licht (UV-Transilluminator, Syngene) detektiert.

3.2.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit dem *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) wurde die ortsgerechte Mutagenese an pIG80-Plasmid-DNA durchgeführt. Hierbei wird die Mutation im Zielgen eingeführt und gleichzeitig das Plasmid amplifiziert. Die Ableitung der Primer (Mutagenese-Primer und Primer zur Amplifikation der Plasmid-DNA) sowie die Durchführung der ortsgerechten Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem Mastercycler der Firma Eppendorf (Hamburg). Der Nukleotid-Austausch von Guanin zu Thymin in Position 71 in *GAL80* aus *K. lactis* führte zur Aminosäure-Substitution von Glycin nach Valin in Position 24. Der Nukleotid-Austausch ist durch Hervorhebung in der Oligonukleotid-Sequenz kenntlich gemacht.

Mutagenese-Primer	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
KIGal80 G24V for	GGT TTC GTT G TTA ACC AGT GGT AAA AGT TGG GTT GCC
Primer zur Amplifikation der Plasmid-DNA	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
URA3 DS	TTA GTT TTG CTG GCC GCA TCT TCT CAA ATA TGC TTC CCA
Amp DS	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC ACC TAT CTC AGC GAT

3.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (68). Hierfür wurde der *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, USA) verwendet. Die Sequenzieransätze, wobei die Konzentration an DNA variierte, sowie das Sequenzierprogramm wurden nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Sequenzierreaktionen wurden in einem Mastercycler der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzieransätze in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einfach destilliertem Wasser auf 100 µl Volumen aufgefüllt. Durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 250 µl 96%igen Ethanol wurden die Reaktionsansätze für 20 min bei 16.000 *rcf* gefällt. Zum Entfernen von Salzen wurden die gefällten Reaktionen zweimal mit 70%igen Ethanol überschichtet und für 5 min bei 16.000 *rcf* zentrifugiert. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte durch einen arbeitsgruppeninternen Sequenzier-Service.

3.2.9.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde 0,5-1 µg DNA eingesetzt. Für die Sequenzierung von *GAL80* aus *K. lactis* an pIG80- und pIG80-G24V-Plasmid-DNA wurden folgende Oligonukleotide als Sequenzier-Primer verwendet.

Sequenzier-Primer	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
KIGAL80 SP1 rv	ATT TAA AGA TTT AAA TGC GCA A
KIGAL80-402 rv	CTC TTC TGC CTG TTG TAC GC
KIGAL80-839C	AGC TGC AAG ATA CGG GTAC C

3.2.9.2 Sequenzierung von chromosomaler-DNA

Zur Sequenzierung von chromosomaler-DNA wurde zunächst ein PCR-Fragment mit *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, das anschließend für die Sequenzierreaktion (0,2-0,3 µg PCR-Fragment) eingesetzt wurde.

Die verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation von DNA-Fragmenten an chromosomaler-DNA, isoliert aus FI4 *GAL80*- und FI4 *sin4Δ P_{ScGAL80}-KIGAL80*-Stämmen, zur Sequenzierung von *ScGAL80* bzw. *KIGAL80* sind nachfolgend angegeben.

Es wurde ein 1,9 kb PCR-Fragment (Primerpaar AC) und ein 0,9 kb PCR-Fragment (Primerpaar BD) für *ScGAL80* amplifiziert. Für die Sequenzierung des 1,9 kb PCR-Fragments wurden die Sequenzier-Primer E, F, G und für das 0,9 kb PCR-Fragment die Sequenzier-Primer H, I eingesetzt. Die Sequenzierung von *KIGAL80* erfolgte an einem 1,2 kb (Primerpaar BJ) und einem 1,0 kb PCR-Fragment (Primerpaar KL). Die für die Sequenzierung des 1,2 kb PCR-Fragments eingesetzten Oligonukleotide waren K, M, N und für das 1,0 kb Fragment J, O.

Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten und zur Sequenzierung von DNA		5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
A	ScGAL80 left	TGA CTT GGT GCT CGA AGA TG
B	ScGAL80 right	TAT AAC GTT CGC TGC ACT GG
C	GAL80 Xmal rv	GGG TAA TTC AGG AAT TTT CTT TG
D	GAL80 StuI fw	ATC GAG ATT GCT GGA AAT GG
E	Gal80 StuI Fw	ATC GAG ATT GCT GGA AAT GG
F	Gal80 StuI RV	CCA TTT CCA GCA ATC TCG AT
G	ScG80 SP 1 RV	AAT CGG TTA CCA CGC TCA T
H	Gal80 Xmal rv	GGG TAA TTC AGG AAT TTT CTT TG
I	Gal80 TS fw	GGG TAT GAT GCA GGT AAA
J	KIGAL80 402 fw	GCG TAC AAC AGG CAG AAG AG
K	KIGAL80-839C	AGC TGC AAG ATA CGG GTAC C
L	ScGAL80-179 fw	CAT TTA CCG GCG CAC TCT
M	KIGAL80 1168 fw	AATCTACGAATCCATTGCCG
N	KIGAL80 488 fw	CCATACATCGTTCGGGCCAA
O	KIGAL80 488 rw	TTGGCCCGAACGATGTATGG

3.2.10 Stammhaltung von Mikroorganismen

Die Stammhaltung der verwendeten Mikroorganismen erfolgte auf Nährplatten bei 8°C. Für eine langfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -70°C aufbewahrt. Für *E. coli* wurden hierzu 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem 50%igen Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen für Hefe wurden aus 600 µl einer Übernachtskultur und 400 µl sterilem 50%igen Glycerin angefertigt und bei -70°C eingefroren.

3.2.11 Herstellung chemokompetenter Hefezellen

Zur Herstellung chemokompetenter Hefezellen wurden 5 ml 2% Glc-YEP Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C und 140 rpm mit einem Schüttler der Firma Infors (Bottmingen-Basel) über Nacht inkubiert. Darauf folgend wurde 50 ml 2% Glc-YEP-Medium für die Hauptkultur mit der gesamten Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 für *K. lactis* bzw. 0,8 für *S. cerevisiae* bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur für 5 min bei 2.600 rcf (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml PLAG-Lösung (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 40% PEG 4.000, 15% Glycerin, pH 7,5) durch Vortexen (Vortex-Genie Mixer, VWR, Darmstadt) resuspendiert. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde ssDNA als *carrier*-DNA (Endkonzentration 0.06 µg µl⁻¹) der Hefe-Zellsuspension zugesetzt. Anschließend wurden 200 µl Aliquots der Hefe-Zellsuspension bei -70°C eingefroren.

3.2.12 Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

3.2.12.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von chemokompetente *E. coli*-Zellen wurde 1-10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transformation durch Hitzeschock wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf antibiotikahaltigen LB-Platten (3.1.9) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Wahl des Antibiotikums entsprach der durch die Plasmide vermittelten Resistenz.

3.2.12.2 Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von chemokompetenten Hefezellen wurde 0,5-1,5 µg Plasmid-DNA in einem maximalen Volumen von 20 µl auf die gefrorenen chemokompetenten Hefezellen pipettiert und anschließend für 30 min bei 37°C und 850 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach weiteren Inkubationsschritten für 30 min bei 37°C und 10 min bei 42°C wurden die transformierten Hefezellen auf Selektionsmedium ausplattiert und für 3-6 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Transformanten auf Selektionsmedium zweifach verklont und jeweils für weitere 3-6 Tage bei 30°C bebrütet, bevor diese zur Analyse herangezogen wurden.

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 *gene replacement* in *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1.1 *knockout* von *GAL80*, *GAL1*, *GAL3* und *SIN4* in *S. cerevisiae*

Zur Amplifikation von Markergenen mit flankierenden DNA-Sequenzen für die homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wurden PCR-Reaktionen an den YDp-Vektoren durchgeführt (3.1.2). Die eingesetzten Primer sind nachfolgend dargestellt. Die Primersequenz für die Amplifikation des auxotrophen Markergens ist durch Unterstreichung von der Sequenz für die homologe Rekombination im Zielgen hervorgehoben. Die PCR-Ansätze betragen 100 µl Volumen und wurden nach der PCR-Reaktion mit PEG 6.000 gefällt (3.2.5) und anschließend in chemokompetente Hefezellen transformiert (3.2.12.2). Zur Transformation wurde 2-4 µg PCR-Produkt eingesetzt. Die Selektion der transformierten Hefezellen erfolgte auf supplementiertem Minimalmedium-Platten. Als Kohlenstoffquelle diente 2% (v/v) Glukose.

Primer zur Amplifikation von Markergenen für das *gene replacement*

(5'-3' Oligonukleotid-Sequenz)

KO GAL80 1734 FW

GAA CGG TGT AGA TCT GGT AAC CAC AAC ATT TGG TCA CAC AAT CGA TAT TTT ACA ACG GCC AGT GAA TTC CCG G

KO GAL80 1734 RV

CCAT TTA ACA ATG TGC CTT GGA ATA AAA GAT GAT CCG GTA CTG TCT TTG GCT GCA GGT CGA CGG

KO SIN4 FW

CTT CTG TTG GTA AAT ATT AGT ATG ATG CTT GGA GAG CAT TTA ATG AGC TGG T ACG GCC AGT GAA TTC CCG G

KO SIN4 RV

AGA AAT TCC AGA CAC TGT CAC TCT CAT TTC TTT TTA TTA AGT CGA GAA GT TTG GCT GCA GGT CGA CGG

KO ScGAL3 FW

TTA CTG AAA CGT ATA TAA TCA TCA TAA GCG ACA AGT GAG GCA ACA CCT TTG ACG GCC AGT GAA TTC CCG G

KO ScGAL3 RV

TAG TGT TAT TGT TCG TAC AAA CAA GTA CCC AAG GCA GGC TTC GAA ACT AAG C TTG GCT GCA GGT CGA CGG

KO GAL1 LEFT

ATG ACT AAA TCT CAT TCA GAA GAA GTG ATT GTA CCT GAG TTC AAT TCT AG ACG GCC AGT GAA TTC CCG G

KO GAL1 RIGHT

ATT CAT ATA GAC AGC TGC CCA ATG CTG GTT TAG AGA CGA TGA TAG CAT TT AGC TTG GCT GCA GGT CGA CGG

Zum Nachweis des *gene replacements* wurde eine analytische PCR durchgeführt. Die hierfür eingesetzten Primer binden in der chromosomalen-DNA an Sequenzen außerhalb des *knockouts* und sind nachfolgend dargestellt. Die Größe des erwarteten Amplifikats für das funktionale Gen und für den *knockout* ist in Kilobasen (kb) angegeben. Die Analyse erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Nachweisprimer für das <i>gene replacement</i>	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz	funktionales Gen (kb)	<i>knockout</i> (kb)
ScGAL80 LEFT	TGA CTT GGT GCT CGA AGA TG	<i>GAL80</i> (2,1)	<i>gal80Δ::URA3</i> (3,2)
ScGAL80 RIGHT	TAT AAC GTT CGC TGC ACT GG		
SIN4 LEFT	TGT ATA TTG CCG TTT GCA GG	<i>SIN4</i> (3,2)	<i>sin4Δ::HIS5</i> (1,6)
SIN4 RIGHT	TTC TGG GGA GGG ATC TTT CT		<i>sin4Δ::URA3</i> (1,5)
ScGAL3L	AAA GAA TGA AAT CGC CAT GC	<i>GAL3</i> (2,0)	<i>gal3Δ::HIS5</i> (1,7)
ScGAL3R	TTG CCG TGG AAA AAT GTG TA		
GAL1UAS1 4 L	ACG CTT AAC TGC TCA TTG CT	<i>GAL1</i> (2,4)	<i>gal1Δ::LEU2</i> (3,4)
GAL1 RIGHT	TGC CCC ACG TAC AAT AAC AA		

3.3.1.2 Konstruktion eines $P_{ScGAL80}$ -*KIGAL80*-Fusionsgens in *S. cerevisiae*

Zur Konstruktion eines Fusionsgens bestehend aus dem *ScGAL80*-Promotor und der *KIGAL80*-kodierenden Gensequenz wurde eine PCR an pIG80- und pIG80-G24V-Plasmid-DNA (3.1.2) durchgeführt. Die Amplifikation der kodierenden DNA-Sequenz von *KIGAL80* erfolgte mit Primern, die flankierende DNA-Sequenzen für die homologe Rekombination im Locus von *ScGAL80* enthielten. Die eingesetzten Primer sind nachfolgend dargestellt. Die Primersequenz für die Amplifikation der *KIGAL80*-Sequenz ist durch Unterstreichung von der Sequenz für die homologe Rekombination im Zielgen hervorgehoben.

Primer zur Amplifikation von *KIGAL80* für die $P_{ScGAL80}$ -*KIGAL80*-Genfusion

(5'-3' Oligonukleotid-Sequenz)

Ko ScGAL80 FW

TCG ATA GTT GGT TTC CCG TTC TTT CCA CTC CCG TCA TGG ACT ACA ACA AG ACG GCC AGT GAA TTC CCG G

Ko ScGAL80 RV

ATA ACG TTC GCT GCA CTG GGG GCC AAG CAC AGG GCA AGA TGC TTT TAT CA AGC TTG GCT GCA GGT CGA CGG

Die PCR-Ansätze betragen 100 µl Volumen und wurden nach der PCR-Reaktion mit PEG 6.000 gefällt (3.2.5). Anschließend wurde 2-4 µg PCR-Produkt in chemokompetente Zellen von FI4 *sin4Δ gal80Δ*, in welchem *GAL80* durch ein funktionales *URA3* ausgeknockt ist, transformiert (3.2.12.2). Die Selektion der Transformanten erfolgte auf 0,1% (w/v) FOA-haltigen Minimalmedium-Platten. Das Minimalmedium wurde mit einer Aminosäure-Lösung ohne Uracil und zusätzlich mit einer 2 mg ml⁻¹ Uracil-Lösung (Endkonzentration 0,05 mg ml⁻¹) supplementiert. Bei diesem 5-FOA und Uracil-haltigem Medium handelt es sich um ein sogenanntes Gegenselektionsmedium. Die Selektion beruht darauf, dass in Uracil-prototrophen Hefezellen 5-FOA im Uracil-Stoffwechselweg zu einem toxischen

Zellgift umgewandelt wird. Transformanten, in denen das *URA3* auf Grund von homologer Rekombination durch *KIGAL80* verloren ging, sind Uracil-auxotroph und somit auf FOA-haltigem Medium lebensfähig. Als Kohlenstoffquelle diente 2% (v/v) Glukose.

Zum Nachweis des *gene replacements* wurde eine analytische PCR an chromosomaler-DNA durchgeführt. Die hierfür eingesetzten Primer binden zum einem im Promotor von *ScGAL80* und zum anderem in der *KIGAL80*-kodierenden Sequenz und sind nachfolgend dargestellt. Die Größe des erwarteten Amplifikats für den Nachweis des Fusionsgens $P_{ScGAL80}$ -*KIGAL80* betrug 1,2 kb. War das *gene replacement* nicht erfolgreich, so war kein PCR-Produkt nachweisbar. Die Analyse erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.7).

Nachweisprimer für das Fusionsgen $P_{ScGAL80}$ - <i>KIGAL80</i>	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
ScGAL80 LEFT	TGA CTT GGT GCT CGA AGA TG
KIGAL80 422C	CTC TTC TGC CTG TTG TAC GC

3.3.2 Plasmid-Integration in *Kluyveromyces lactis*

Die pIG80-Plasmide wurden mit Eco81I linearisiert und in den *K. lactis*-Stamm JA6/D801R wie unter 3.2.12.1 beschrieben transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Uracil-Prototrophie. Uracilprototrophe Kolonien wurden auf Selektionsmedium, dass mit X-Gal (Endkonzentration $4 \mu\text{g ml}^{-1}$) versetzt worden war, verklont. Die Klone mit der niedrigsten LAC-Expression wurden zur weiteren Charakterisierung mittels PCR und *Southern-Blot*, wie aber beschrieben, herangezogen (63).

3.3.3 X-Gal-Plattentest zur phänotypischen Charakterisierung von Hefe

Zur phänotypischen Charakterisierung von Hefestämmen wurde ein X-Gal-Plattentest durchgeführt. Hierzu wurden supplementierte Minimalmedium-Platten mit X-Gal (Endkonzentration $4 \mu\text{g ml}^{-1}$) als Indikator für die β -Galaktosidase-Aktivität hergestellt. Die Kohlenstoffquelle und deren Konzentration wurden variiert. Für die Analyse wurden Einzelkolonien der Hefestämme für 14-16 h in Flüssigmedium bei 30°C und 140 rpm angezogen. Als Kohlenstoffquelle diente Galaktose oder Glukose. Darauf folgend wurde in sterilen einfach destilliertem Wasser eine Hefe-Zellsuspension einer OD_{600} von 0,4 hergestellt, wovon ausgehend eine serielle Zellverdünnung mit dem Faktor 1:10 angefertigt wurde. Anschließend wurden $3 \mu\text{l}$ der Hefe-Zellsuspensionen auf X-Gal Platten getropft. Nach dem Trocknen der Tropfen bei RT wurden die X-Gal-Platten bei 30°C für mehrere Tage inkubiert. Anschließend wurden die auf den X-Gal-Platten erhaltenen Phänotypen der Hefen durch Scannen dokumentiert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (69). Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 7% (v/v) in Sammelgelpuffer (125 mM Tris, 0,1% SDS, pH 6,8) und die des Trenngels 15% (v/v) in Trenngelpuffer (125 mM Tris, 0,1% SDS, pH 8,8). Die Polymerisation der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte durch Zugabe von TEMED und APS. Die Proben wurden mit SDS-Ladepuffer (5fach: 250 mM Tris, 25% Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 12,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,25 mg ml⁻¹ Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt und die Proteine nach der Größe bei 32 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 187 mM Glycin, 0,1% SDS) elektrophoretisch in einem Mini-PROTEAN Gelelektrophorese-System III (Bio-Rad, München) aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch eine Colloidal-Coomassie-Färbung (20% Ethanol, 2% Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250). Hierzu wurden die SDS-Gele über Nacht in Colloidal-Coomassie-Färbelösung inkubiert und darauffolgend für 30 min gewaschen (5% Ethanol, 7,5% Essigsäure).

3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit* (Pierce, USA) nach Angaben des Herstellers. Die molaren Konzentrationen von Proteinlösungen wurden mit einer apparenten Molekülmasse von 53,8 kDa für NHKIGal80, 52,2 kDa für IHKIGal80 und 51,0 kDa für NHScGal80 berechnet. Die in der Arbeit angegebenen molaren Konzentrationen beziehen sich hierbei auf das Gal80-Monomer.

3.4.3 Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität

3.4.3.1 Galaktokinase-Assay

Die Galaktokinase-Aktivität von KIGal1, eine ATP abhängige Enzymkatalyse von Galaktose zu Galaktose-1-phosphat, wurde durch einen gekoppelten Enzymtest gemessen (33). Der Verbrauch von ATP und die damit verbundene Bildung von ADP wurde mit Hilfe der eingesetzten Kopplungsenzyme Pyruvat-Kinase (PK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Die Messgröße im gekoppelten Enzymtest war der Verbrauch von NADH, welcher photometrisch über einen Zeitraum von 3 min bei 340 nm ermittelt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde in 100 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM Kaliumacetat, 1 mM ATP, 0,25 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 1 mM Fruktose-1,6-bisphosphat und 6,6/13,5 U ml⁻¹ der Kopplungsenzyme PK/LDH, pH 7,9 bei 30°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde mit NHKIGal1 für 5 min bei 30°C inkubiert, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von 25 µl 1 M Galaktose-Lösung gestartet wurde. Die eingesetzte Konzentration an NHKIGal1 richtete sich nach der Aktivität der Proteinpräparation und wurde so gewählt, dass eine Abnahme der Absorption von NADH von 0,1-0,2 Einheiten pro Minute erfolgte. Die Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Alexander Anders (Institut für Biologie, Halle (Saale)).

3.4.3.2 Einschritt-Inhibierungsexperiment

Zur Bestimmung der Interaktion von Gal80 und der Gal80-Varianten aus *K. lactis* mit Gal1 wurden Einschritt-Inhibierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden 475 µl des bei 30°C inkubierten und mit NHKGal1 versetzten Reaktionsgemisches (3.4.3.1) in Küvetten überführt. Es konnten bis zu 6 Messungen im verwendeten Photometer (Beckman BU 640) parallel durchgeführt werden. Bei jeder Messreihe diente ein Ansatz, wo kein zusätzliches Protein zugesetzt wurde, als Referenz. Relativ zu diesem Referenzwert wurden die Galaktokinase-Aktivitäten der Proben, welche zusätzlich Gal80 und/oder das KGal4-Peptid (3.1.4) enthielten, ermittelt. Die Konzentration an NHKGal80 im Reaktionsansatz betrug 380 nM und die des KGal4-Peptids 1,2 µM. Gal80 lag in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, pH 8,2 vor. Für die Untersuchung des Einflusses von NADP auf die KGal1-KGal80- bzw. KGal4-Peptid-KGal80-Interaktion wurden die Einschritt-Inhibierungsexperimente in Gegenwart von 1 mM NADP durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 520 µl und wurde in entsprechenden Ansätzen mit Puffer (20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, pH 8,2) auf das Volumen aufgefüllt.

3.4.3.3 Zweischnitt-Inhibierungsexperiment

Um Interferenzen zwischen NAD(H) und NADP im Einschritt-Inhibierungsexperiment auszuschließen wurde ein Zweischnitt-Inhibierungsexperiment durchgeführt. Hierzu wurde die Reaktion analog zum Einschritt-Inhibierungsexperiment, jedoch ohne NADH, PEP und PK/LDH, durchgeführt (3.4.3.1). Das Reaktionsvolumen wurde im Zweischnitt-Inhibierungsexperiment verdoppelt. Die Konzentration an eingesetzten NHKGal80 und NHKGal80-W31G im Reaktionsansatz betrug 380 nM. Die Konzentration des KGal4-Peptids (3.1.4) im Ansatz mit NHKGal80 betrug 1,2 µM bzw. im Ansatz mit NHKGal80-W31G 1,5 µM. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von Galaktose wurden zu definierten Zeitpunkten 200 µl Aliquots dem Reaktionsansatz entnommen und für 15 min bei 85°C inaktiviert. Die Probe zum Zeitpunkt 0 min wurde vor Zugabe von Galaktose entnommen. Anschließend wurde der ADP Anteil in den Aliquots mit Hilfe der Kopplungsenzyme PK/LDH in Gegenwart von NADH und PEP bestimmt. Zur Messung wurden Probe und Reaktionsgemisch (100 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM Kaliumacetat, 4 mM PEP, 13,2/27 U ml⁻¹ der Kopplungsenzyme PK/LDH, 0,5 mM NADH, pH 7,9) in gleichen Verhältnissen gemischt.

3.4.4 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

3.4.4.1 Kultivierung von Hefe für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden Hefekulturen einer Einzelkolonie in supplementiertem Minimalmedium (3.1.9.2) angezogen. Als Kohlenstoffquelle für die Vorkultur diente 0,5% Glukose. Zur Induktion der LAC-Expression wurden die Hefezellen in Induktionsmedium (0,5% Galaktose) überführt, wobei eine OD₆₀₀ von 0,6 oder 0,9 eingestellt wurde. Hierzu wurde ein entsprechendes Volumen der Vorkultur für 5 min bei 2.600 *rcf* (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, resuspendiert und in das Induktionsmedium überführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden 20 OD-Einheiten der Kultur für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität für 5 min bei 2.600 *rcf* zentrifugiert und bei 4°C geerntet. Die β-Galaktosidase-Aktivität Zeitpunkt 0 min entsprach der Vorkultur. Die geernteten Hefezellen wurden in 5 ml 8°C kaltem β-Gal-Puffer (5 mM Tris, 5% Glycerin, 10 mM KCl, pH 7,8) resuspendiert und erneut für 5 min bei 2.600 *rcf* und 4°C

zentrifugiert. Die Hefezellen wurden entweder direkt weiter verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.4.4.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefe

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden die Hefezellen mit 500 µl 8°C kaltem β-Gal-Puffer (3.4.4.1) resuspendiert und in ein Reagenzglas überführt. Nach Zugabe von 1 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) wurden die Zellen in einem Vibrax (230 V, VWR, Darmstadt) für 2 x 3 min bei 4°C aufgeschlossen. Das Zellysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 20.000 *rcf* (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Rohextrakt wurde direkt zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität eingesetzt.

3.4.4.3 β-Galaktosidase-Assay

Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Miller bei 30°C in β-Gal-Puffer (3.4.4.1) (70). Als Substrat für die β-Galaktosidase diente *o*-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG). Es wurde eine 4 mg ml⁻¹ ONPG-Lösung in β-Gal-Puffer hergestellt und bei 30°C inkubiert. Zur Messung wurden 500 µl ONPG-Lösung in einer Küvette vorgelegt, die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Probe (Rohextrakt bzw. Verdünnung des Rohextraktes in β-Gal-Puffer) gestartet und die Absorption bei 420 nm über einen Zeitraum von 3 min gemessen. Die Änderung der Absorption pro Minute betrug 0,03-0,07. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mit einem Extinktionskoeffizienten von 4500 M⁻¹ cm⁻¹ für *o*-Nitrophenol. Für die Berechnung der Enzymaktivität in mU mg⁻¹ wurde die Proteinkonzentration des Rohextraktes bestimmt (3.4.2).

3.4.5 Herstellung und Reinigung von rekombinanten Proteinen

3.4.5.1 Herstellung von Gal80

Die Herstellung von Gal80 und der Gal80-Varianten erfolgte von pET-Vektoren in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (3.1.2, 3.1.6). Die *E. coli*-Zellen wurden in antibiotikahaltigem LB-Medium (3.1.9.1) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 bei 37°C und 160 *rpm* (Schüttler, Infors, Bottmingen-Basel) vorgezogen. Anschließend wurden die Zellen zur Induktion der Proteinherstellung in Induktionsmedium (3.1.9.1) überführt, wobei eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt wurde. Die Zellen wurden für 15 Stunden bei 26°C und 160 *rpm* (Schüttelinkubator Multitron, Infors, Bottmingen-Basel) inkubiert, bevor diese durch Zentrifugation für 15 min bei 6.600 *rcf* (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JLA-10.500, Beckman Coulter, USA) geerntet wurden. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren und gelagert.

3.4.5.2 Zellaufschluss und Reinigung von Gal80

Die gefrorenen *E. coli*-Zellen wurden in 4°C kaltem Aufschlusspuffer (50 mM, 20 mM NaCitrat, 10 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,1% (v/v) Tween 20, Tris pH 8,0) resuspendiert und auf Eis durch Ultraschall (Branson Sonifier S-250A, USA) aufgeschlossen. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurde eine Protaminsulfat-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde der Rohextrakt mit einer konzentrierten wässrigen Protaminsulfatlösung tropfenweise bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 0,05% (w/v) Protaminsulfat versetzt. Anschließend wurden, zum Entfernen der unlöslichen Bestandteile, zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12.000 *rcf* (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA 25.50,

Beckman Coulter, USA) und nach Überführen des Überstands in einen neuen Zentrifugationsbecher eine weitere Zentrifugation für 20 min bei 48.000 *rcf*. Die Reinigung der mit einem 6fachen Histidin-*tag* hergestellten Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie mit einem GradiFrac System (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) bei 4°C. Als Säulenmaterial diente Ni-Sepharose Fast-Flow (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg). Der pH-Wert der Proteinlösung wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von NaOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt, bevor diese auf die mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Ni-Sepharose-Säule mit 1 ml min⁻¹ aufgetragen wurde. Nach Auftragung der Proteinlösung folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml min⁻¹. Hierzu wurde die Säule mit einem Säulenvolumen mit Aufschlusspuffer und mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris, 20 mM NaCitrat, 10 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 8,0) gespült. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM Tris, 20 mM NaCitrat, 10 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 8,0) mit 1 ml min⁻¹. Das Eluat wurde manuell gesammelt und anschließend konzentriert (3.4.6). Die Proteinlösung wurde entweder direkt weiter verwendet oder mit Glycerin (Endkonzentration 10% (v/v)) versetzt und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Die Affinitätschromatographie stellte nur eine unzureichende Reinigung dar, denn das Eluat war noch mit Wirtsproteinen aus *E. coli* verunreinigt. Es wurde eine zweite Reinigung von Gal80 und der Gal80-Varianten mittels Gelfiltration bei 4°C durchgeführt. Die Gelfiltration erfolgte unter Verwendung einer HighLoad 16/60 Superdex 200pg-Säule mit einem Äkta Purifier FPLC-System (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) mit 1 ml min⁻¹. Die Gelfiltrationssäule wurde mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer (20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8,2) äquilibriert und anschließend die Proteinlösung mit Hilfe eines Superloops (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) auf die Säule gespült. Es wurden 2 ml-Fraktionen automatisch (Fraktionierer Frac-900, Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE (3.4.1) analysiert. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und konzentriert (3.4.6). Die Proteinlösungen wurden mit Glycerin (Endkonzentration 10% (v/v)) versetzt und bis zur weiteren Verwendung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

3.4.5.3 Herstellung und Reinigung von KlGal1

Die Herstellung von KlGal1 erfolgte vom pETNHG1-Vektor in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (3.1.2, 3.1.6). Die Herstellung und Reinigung mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration von KlGal1 wurde wie aber beschrieben durchgeführt und freundlicherweise von Dr. Alexander Anders (Institut für Biologie, Halle) zur Verfügung gestellt (71).

3.4.6 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Konzentrierung sowie zum Pufferwechsel von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore, USA) mit einer Ausschlussgröße von 30.000 kDa verwendet. Die Konzentrierung bzw. der Pufferwechsel von Proteinlösungen erfolgte bei 4°C und 2.600 *rcf* (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg).

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Analytische Ultrazentrifugation

Ultrazentrifugationsexperimente wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckmann Coulter, USA) mit einem Rotor 50Ti durchgeführt. Die Konzentration an Gal80 betrug 30-300 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Sedimentationsgleichgewichts-Experimente wurden in einer Doppelsektorzelle (Referenz- und Probenzelle) bei 20°C und 6.000 bzw. 8.000 *rpm* durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption bei 230 und 280 nm gemessen. Die Analyse der NADP-Bindung an Gal80 erfolgte in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8,2 wobei die Konzentration an NADP variiert wurde. Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden bei 20°C und 40.000 *rpm* durchgeführt. Hierzu wurde für die Analyse der NADP-Bindung an Gal80 die Amplitude des Absorptionssignals in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration quantifiziert. Die eingesetzte NADP-Lösung wurde in Puffer angefertigt. Die Durchführung sowie die quantitative Auswertung der analytischen Ultrazentrifugationsexperimente zur Bestimmung von Sedimentationskonstanten und Molekulargewichten erfolgte durch Herrn PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle (Saale)). Alle Daten wurden mit der von Beckmann Coulter bereitgestellten Software analysiert.

3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Bestimmung der Dinukleotid-Bindung von Gal80 und der Gal80-Varianten erfolgte durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren an einem Fluoro-Max 2 Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) unter Verwendung einer 10 mm x 4 mm Halbmikro-Fluoreszenzküvette (Hellma, München) in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8,2 bei 20°C. Die Fluoreszenzspektren von Gal80 wurden von 305 bis 380 nm mit einer Schrittweite von 0,5 nm aufgezeichnet, wobei drei Einzelspektren gemittelt wurden. Die Anregung der Proben erfolgte bei 295 nm. Für Anregung und Emission wurde eine Spaltbreite von 5 nm verwendet. Die Integrationszeit bei jeder Wellenlänge betrug 0,5 sec. Die Konzentration von NHKIGal80, NHKIGal80-G24V und NHKIGal80-H99L betrug 1 μM . Die Konzentration von NHKIGal80-W31G betrug 2 μM und NHScGal80 1,5 μM . Für die Bestimmung der Dinukleotid-Bindung wurde NAD(P)(H) zu Gal80 titriert und die Fluoreszenzspektren nach 5 min Inkubationszeit aufgenommen. Die eingesetzten NAD(P)(H)-Lösungen wurden in Puffer angefertigt. Die Dinukleotid-Bindung wurde in An- und Abwesenheit von einem KIGal4-Peptid (AD-22, 3.1.4) bestimmt. Hierzu wurde Gal80 mit 10 μM AD-22 für 5 min inkubiert und anschließend mit NAD(P)(H) titriert. Alle Spektren wurden für Verdünnungseffekte sowie auf Puffer- und NAD(P)(H)-Spektren korrigiert. Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten von Gal80 aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* für Dinukleotide, wurden unterschiedliche Auswerteverfahren zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten herangezogen. Die Auswertung erfolgte am Maximum der Tryptophanfluoreszenz. Zur Korrektur von inneren Filtereffekten sowie von dynamischen Quencheffekten wurden dieselben Experimente mit N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA), einem Tryptophan-Analogen, durchgeführt. Die Konzentration an NATA betrug 1,5 μM . Die Berechnung der Quenchkonstante k_q bei 345 nm, erfolgte mit Hilfe der Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung 1) (72). F_0 bezeichnet das Fluoreszenzsignal in Abwesenheit des Quenchers und F das Fluoreszenzsignal in Anwesenheit des Quenchers. $[Q]$ steht für die Konzentration an Quencher in mM.

Gleichung 1:
$$F_0/F = 1 + k_q \cdot [Q].$$

Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D der KIGal80-Dinukleotid-Bindung wurden die korrigierten Fluoreszenzsignale bei 345 nm in Abhängigkeit von der Dinukleotidkonzentration aufgetragen. Die Berechnung des K_D -Wertes für die KIGal80-Dinukleotid-Interaktion erfolgte nach Gleichung 2, wobei S das Fluoreszenzsignal und S_{\max} die maximale Amplitude des Fluoreszenzsignals bezeichnet (73). $[R]_0$ bezeichnet die Konzentration an KIGal80 und $[L]_0$ die Konzentration an Dinukleotid.

Gleichung 2:
$$S = \left(\frac{([R]_0 + [L]_0 + K_D) - \sqrt{([R]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [R]_0 \cdot [L]_0}}{2 \cdot [R]_0} \right) \cdot S_{\max}$$

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für ScGal80 erfolgte mit Hilfe der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung 3) (74). Für die Berechnung der K_D -Werte wurden die korrigierten Fluoreszenzsignale bei 347 nm, dem Maximum der Tryptophanfluoreszenz von ScGal80, als $\frac{F_0}{F_0 - F}$ in Abhängigkeit von $1/[Q]$ aufgetragen. Der Anteil an Fluorophor, der dem Quencher zugänglich ist, ist durch f_a bezeichnet.

Gleichung 3:
$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a \cdot K_D \cdot [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

3.5.3 stopped-flow-Fluoreszenzspektroskopie

Die Bestimmung der Kinetik der KIGal80-NAD(P)-Interaktion wurde mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie in einer *stopped-flow*-Apparatur SX.18MV (Applied Photophysics, UK) in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8,2 bei 20°C durchgeführt. Hierbei wurde die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 295 nm direkt nach dem Mischen der Proben gemessen. Die Proben wurden aus zwei Spritzen gleicher Volumina im Verhältnis 1+1 gemischt. Die eine Spritze enthielt 19 µM NHKIGal80 und die andere Spritze eine NAD- oder NADP-Lösung in Puffer, wobei die Konzentration an Dinukleotid variiert wurde. Die Durchführung sowie die quantitative Auswertung der *stopped-flow*-Experimente zur Bestimmung von Dissoziations- und Geschwindigkeitskonstanten erfolgte durch Herrn PD Dr. Ralph P. Golbik (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle (Saale)).

3.5.4 CD-Spektroskopie

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte mit einem Jasco-810 Spektropolarimeter (Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt), was zur genauen Kontrolle der Temperatur mit einem Peltierelement ausgestattet war, bei 20°C. Die Berechnung der molaren Elliptizität (Θ_{molar}) in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ aus der gemessenen Elliptizität (Θ_{obs}) in mdeg erfolgte für Nah-UV CD-Spektren nach Gleichung 4.

Gleichung 4:
$$\Theta_{molar} = \frac{(\Theta_{obs} \cdot 100 \cdot M_r)}{(c \cdot l)}$$

Für Fern-UV CD-Spektren wurde die molare Elliptizität pro Aminosäurerest nach Gleichung 5 berechnet (75).

Gleichung 5:
$$\Theta_{molar} = \frac{(\Theta_{obs} \cdot 100 \cdot M_r)}{(c \cdot l \cdot N_A)}$$

M_r bezeichnet die apparente Molekülmasse des Proteins in Da, l die optische Weglänge in cm, c die Proteinkonzentration in mg ml^{-1} und N_A die Anzahl der Aminosäuren. Die Anzahl der Aminosäurereste für NHKIGal80 betrug 482 und für IHKIGal80 466.

3.5.4.1 Nah-UV-Vis CD-Spektroskopie

Die Nah-UV CD-Spektren von KIGal80 wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl und 60 mM EDTA, pH 8,2 mit einer 1 cm Küvette (Hellma, München) aufgenommen. Für die Bestimmung der Dinukleotid-Bindung wurde NAD(P) zu Gal80 titriert und nach 5 min Inkubationszeit die Nah-UV-Vis CD-Spektren von 290 bis 500 nm mit einer Schrittweite von 0,2 nm und einer Geschwindigkeit von 500 nm min^{-1} aufgezeichnet. Die Integrationszeit betrug 1 sec. Es wurden 12 Einzelspektren gemittelt. Die eingesetzte Konzentration an NHKIGal80 sowie NHKIGal80-G24V, -W31G und -H99L betrug $120 \mu\text{M}$. Alle Spektren wurden für Verdünnungseffekte sowie für Puffer- und NAD(P)-Spektren korrigiert. Die eingesetzten NAD(P)-Lösungen wurden in Puffer angefertigt.

3.5.4.2 Fern-UV CD-Spektroskopie

Das Fern-UV CD-Spektrum von Gal80 wurde in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8,2 mit einer 0,1 mm Küvette (Hellma, München) aufgenommen. Die Aufzeichnung des Fern-UV CD-Spektrums erfolgte von 190 bis 250 nm mit einer Geschwindigkeit von 50 nm min^{-1} , einer Schrittweite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 sec. Zur Analyse der NADP-Bindung wurde NADP zu NHKIGal80 titriert und das Fern-UV CD-Spektrum nach 5 min Inkubationszeit aufgenommen. Es wurden 5 Einzelspektren gemittelt. Die eingesetzte Konzentration an NHKIGal80 sowie NHKIGal80-G24V, -W31G und -H99L betrug $50 \mu\text{M}$. Alle Spektren wurden für Verdünnungseffekte sowie auf Puffer- und NADP-Spektren korrigiert. Die eingesetzte NADP-Lösung wurde in Puffer angefertigt.

3.5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Bestimmung der NAD(P)(H)-Bindung von NHKIGal80 erfolgte mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8,2 bei 20°C . Alle Experimente wurden mit Hilfe eines VP-ITC Micro Calorimeter (MicroCal, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die Proteinprobe und die Dinukleotid-Lösung wurden zuvor bei 20°C inkubiert und entgast. Die Messzelle enthielt eine Lösung von $150 \mu\text{M}$ NHKIGal80, die mit 15 mM NAD(H) oder 8 mM NAD(P)H titriert wurde. Die eingesetzte Dinukleotid-Lösung wurde in Puffer angefertigt. Die Durchmischung der Lösung in der Messzelle erfolgte durch ein Rührpaddel. Es erfolgten insgesamt 36 Injektionen ($1 \mu\text{l}$ Initialinjektion, $10 \times 2,5 \mu\text{l}$ und $25 \times 10 \mu\text{l}$) in einem Intervall von 320 sec. Die Messgröße ist die Heizleistung ΔP ($\mu\text{cal sec}^{-1}$), die aufgrund biochemischer und physikalischer Reaktionen in der Messzelle verändert wird, um die Temperatur in der Messzelle wieder einzustellen. Zur Korrektur von Wärmeeffekten durch Verdünnung der Dinukleotid-Lösung in Puffer sowie durch Mischen der Proben-Lösung in der Messzelle wurden dieselben Experimente mit Puffer durchgeführt. Nach Subtraktion der Kontrollwerte der NHKIGal80-Dinukleotid-Bindung wurden die ermittelte Reaktionswärmen Q (kcal mol^{-1}) jeder Injektion gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner

aufgetragen. Die Enthalpie ΔH , die Bindungskonstante K_B und der stöchiometrische Faktor N wurden aus der erhaltenen Titrationskurve nach einem Einzentren-Bindungsmodell bestimmt. Die Berechnung der freien Enthalpie ΔG^0 (Gibbs-Energie) und der freien Entropie ΔS^0 erfolgte mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 6) und der in der Gleichung 7 dargestellten Beziehung für die freie Enthalpie.

$$\text{Gleichung 6:} \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\text{Gleichung 7:} \quad \Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K_B$$

Die Dissoziationskonstante ergibt sich aus der Beziehung $K_D = K_B^{-1}$. T bezeichnet die Temperatur in Kelvin. R bezeichnet die universelle Gaskonstante in $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$. Die Umrechnung von Kalorie in Joule erfolgte anhand der Definition für die thermochemische Kalorie von $1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der von MicroCal bereitgestellten Software.

3.5.6 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationsexperimente wurden mit einem SMART-System (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule Superdex 200 PC 3.2/30 (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg) bei 25°C durchgeführt. Als Laufpuffer diente 20 mM Tris , 100 mM NaCl , $\text{pH } 8.2$ oder 20 mM Tris , 100 mM NaCl , 60 mM EDTA , $\text{pH } 8.2$. Die Flussrate betrug $100 \mu\text{l min}^{-1}$. Die zu analysierende Proteinlösung befand sich im jeweiligen Laufpuffer und wurde für 30 min bei Raumtemperatur vor dem Experiment inkubiert. Für ein Experiment wurde $10 \mu\text{l}$ Proteinlösung auf die zuvor mit Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Detektion erfolgte bei 280 nm . Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Proteinstandards wurde ein Kalibrierungs-Kit von Amersham Bioscience (GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Reinigung von Gal80

Die Herstellung von KIGal80 erfolgte vom pET-Vektor in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Die Herstellung des Wildtypproteins von KIGal80 erfolgte mit einem N-terminalen (His)₆-tag (NHKIGal80) sowie mit einem internen (His)₆-tag (IHKIGal80). Die interne Histidin-Markierung befindet sich in einer Region, welche keine Ähnlichkeit zwischen den sonst stark konservierten homologen Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* aufweist (29). Die KIGal80-Varianten wurden mit einem N-terminalen (His)₆-tag (NHKIGal80-G24V, -W31G, -H99L, -E122G, -D88A) exprimiert. Mit Hilfe des etablierten Protokolls konnten ausreichende Mengen von KIGal80 für die proteinchemische Analytik bereitgestellt werden (71). Hierzu erfolgte die Reinigung von KIGal80 mittels Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration. Zur Reinigung wurde den Puffern entweder Citrat bei der Affinitätschromatographie oder EDTA bei der präparativen Gelfiltration zugesetzt, da dies zu einer Stabilisierung der dimeren Form von KIGal80 gegenüber dem Monomer und Tetramer führt (33; 71). Der stabilisierende Effekt von Citrat bzw. EDTA beruht wahrscheinlich auf einer Abschirmung der hydrophoben Oberflächen des Proteins gegenüber der wässrigen Umgebung wodurch eine unspezifische hydrophobe Protein-Protein-Wechselwirkung, die zur Bildung von Oligomeren und Aggregaten führt, verhindert wird. Für NHKIGal80 bzw. IHKIGal80 konnten 24 mg gereinigtes Protein aus einem Liter Kultur erhalten werden. Die erhaltene Menge an reinem Protein der mutierten NHKIGal80-Varianten war gegenüber dem Wildtypprotein mit 2-10 mg aus einem Liter Kultur deutlich geringer.

Analog zu KIGal80 wurde das homologe Protein aus *S. cerevisiae* mit einem N-terminalen (His)₆-tag (NHScGal80) exprimiert und gereinigt. ScGal80 besitzt wie KIGal80 die Fähigkeit zur Oligomerisierung (4; 40). In analytischen Gelfiltrationsexperimenten eluierte das Protein nicht in spezifischen Peaks sondern über einen großen Bereich von der Säule (40). Daher wurde die Reinigung von NHScGal80 ebenfalls mit Citrat bzw. EDTA im Puffer vorgenommen, um möglicherweise eine oligomere Form zu stabilisieren. In Abbildung 1 sind die Elutionsprofile der präparativen Gelfiltration von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* dargestellt. KIGal80 eluierte bei 70 ml Volumen als Dimer mit einer apparenten Molekülmasse von 107 kDa von der Säule. Hierbei handelt es sich um eine stabile dimere Form, welche in analytischen Gelfiltrationsexperimenten und analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten eingehend untersucht worden ist (33; 71). ScGal80 eluierte in einem zu KIGal80 vergleichbaren Peak von der Säule (Abbildung 1). Diesem Elutionspeak kann somit die dimere Form von ScGal80 mit einer Molekülmasse von 104 kDa zugeordnet werden. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass es sich bei dieser Fraktion um reines ScGal80 handelte, welches für spektroskopische Analysen eingesetzt wurde (Abbildung 2).

Die Ausbeute an NHScGal80 mit 0,4 mg aus einem Liter Kultur war um den Faktor 60 geringer im Vergleich zu NHKIGal80. Auf eine Quantifizierung des in löslicher und unlöslicher Form hergestellten NHScGal80 sowie einer Optimierung der Herstellung von löslichen NHScGal80 wurde verzichtet, da die bereitgestellte Menge eine hohe Reinheit aufwies und für die proteinchemische Analytik ausreichend war.

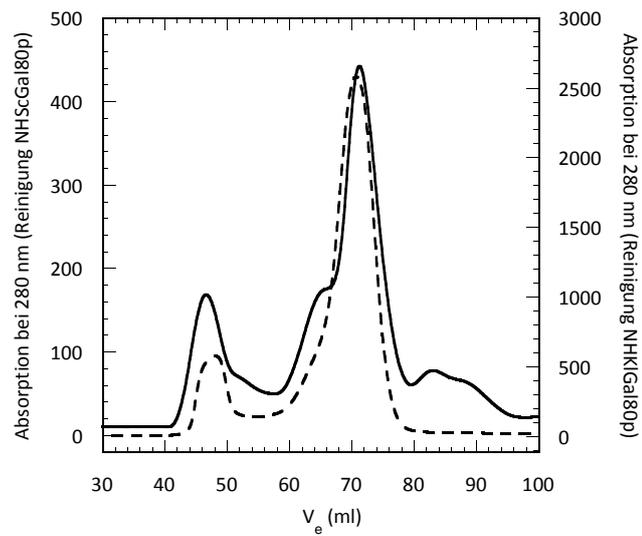


Abbildung 1. **Elutionsprofile der präparativen Gelfiltration von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.**
 Elutionsprofile der präparativen Gelfiltration von NHScGal80 (—) und NHKGal80 (--) in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C. Der Peak bei 70 ml Elutionsvolumen entspricht der dimeren Form von Gal80.

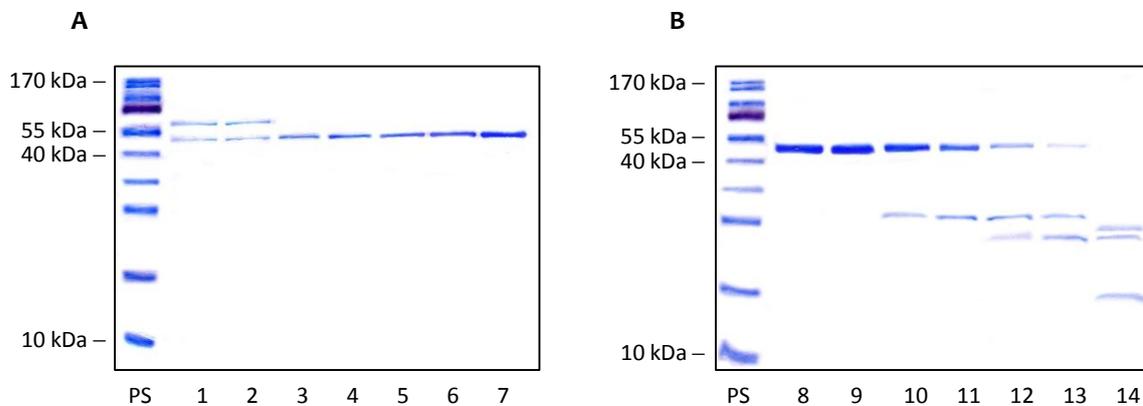


Abbildung 2. **Analyse der Elutionsfraktionen der präparativen Gelfiltration von Gal80 aus *S. cerevisiae*.**
 Dargestellt sind die durch SDS-PAGE analysierten Elutionsfraktionen der präparativen Gelfiltration von NHScGal80 (52,2 kDa). Die Elutionsfraktionen sind nach dem Elutionsvolumen in ml bezeichnet. **A.** PS: Proteinstandard in kDa, 1: 58-63 ml, 2: 64-66 ml, 3: 67 ml, 4: 68 ml, 5: 69 ml, 6: 70 ml, 7: 71 ml. **B.** PS: Proteinstandard in kDa, 8: 72 ml, 9: 73 ml, 10: 74 ml, 11: 75 ml, 12: 76 ml, 13: 79 ml, 14: 79-84 ml.

4.2 Charakterisierung der Gal80-Dinukleotid-Interaktion *in vitro*

4.2.1 Thermodynamische Untersuchungen der Gal80-Dinukleotid-Interaktion

4.2.1.1 Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* besitzen unterschiedliche Affinitäten für Dinukleotide

Für die Untersuchung, ob die homologen Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* Dinukleotide binden können, wurden Messungen mittels Fluoreszenzspektroskopie vorgenommen. Hierzu wurden Fluoreszenzspektren von Gal80 aufgezeichnet. Tryptophane sind intrinsische Fluorophore, die selektiv bei 295 nm angeregt werden können. Die Intensität und Lage des anschließend aufgezeichneten Emissionsspektrums ist von der Mikroumgebung des Indolring des Tryptophans, insbesondere von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels, abhängig. Wird die Mikroumgebung des Indolring z.B. durch konformative Übergänge im Protein, Zusammenlagerung von Untereinheiten, Bindung eines Liganden oder Denaturierung verändert, kann dies einen Einfluss auf das Emissionsspektrum haben. Hierbei kann eine Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Zudem kann eine Verschiebung des Maximums des Emissionsspektrums aufgrund konformativer Übergänge im Protein auftreten. Hat zum Beispiel die Liganden-Bindung eine konformative Änderung des Proteins oder Konformationsänderung des Tryptophans zu Folge, so dass der Indolring mehr dem Lösungsmittel exponiert ist, wird dies durch eine bathochrome Verschiebung, d.h. eine Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz zu höheren Wellenlängen, deutlich. Eine durch Nukleotid-Bindung induzierte Konformationsänderung des Tryptophans konnte zum Beispiel für die Arsa-ATPase aus *E. coli* gezeigt werden (76). Gal80 besitzt in der Aminosäuresequenz drei konservierte Tryptophanreste in den Positionen 31, 123 und 184 in *S. cerevisiae* bzw. 31, 123 und 185 in *K. lactis*. Da sich die Tryptophanreste in der Rossmann-Falte (Tryptophanrest 31 und 123) und in deren räumlichen Nähe (Tryptophanrest 185 bzw. 184) befinden, können diese als Reporter für die Dinukleotid-Bindung dienen. Auffällig ist, dass alle drei Tryptophanreste in einer Spalte zwischen der β -Faltblatt-Dimerisierungsdomäne und der Rossmann-Falte von Gal80 lokalisiert sind (Abbildung 3).

Für die Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde eine Dinukleotid-Lösung zu Gal80 titriert, die Tryptophanfluoreszenz von 305 bis 380 nm aufgezeichnet und am Maximum der Tryptophanfluoreszenz ausgewertet (3.5.2). Für KlGal80 konnte ein Maximum der Tryptophanfluoreszenz bei 345 nm beobachtet werden. Dagegen traten im Fluoreszenzspektrum von ScGal80 zwei Banden bei 335 nm und 347 nm auf (Abbildung 4). Die Bande bei 335 nm könnte vom Tryptophan 123 resultieren, da dieses tiefer in der Spalte und somit stärker im hydrophoben Kern des Proteins lokalisiert ist. Für KlGal80 und ScGal80 konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten durch Titration mit Dinukleotiden beobachtet werden, wobei eine Verschiebung des Maximums der Tryptophanfluoreszenz nicht auftrat (Abbildung 4). Zudem hatte die Position der Histidin-Markierung keinen signifikanten Einfluss auf die KlGal80-Dinukleotid-Interaktion (Tabelle 1). Interessanterweise zeigte sich, dass die homologen Gal80 Dinukleotide mit unterschiedlicher Affinität binden, wobei für beide Proteine eine höhere Affinität für NADP gegenüber NAD bestimmt wurde (Tabelle 1). Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten der Dinukleotid-Bindung wurden für KlGal80 und ScGal80 unterschiedliche Auswerteverfahren herangezogen (3.5.2).

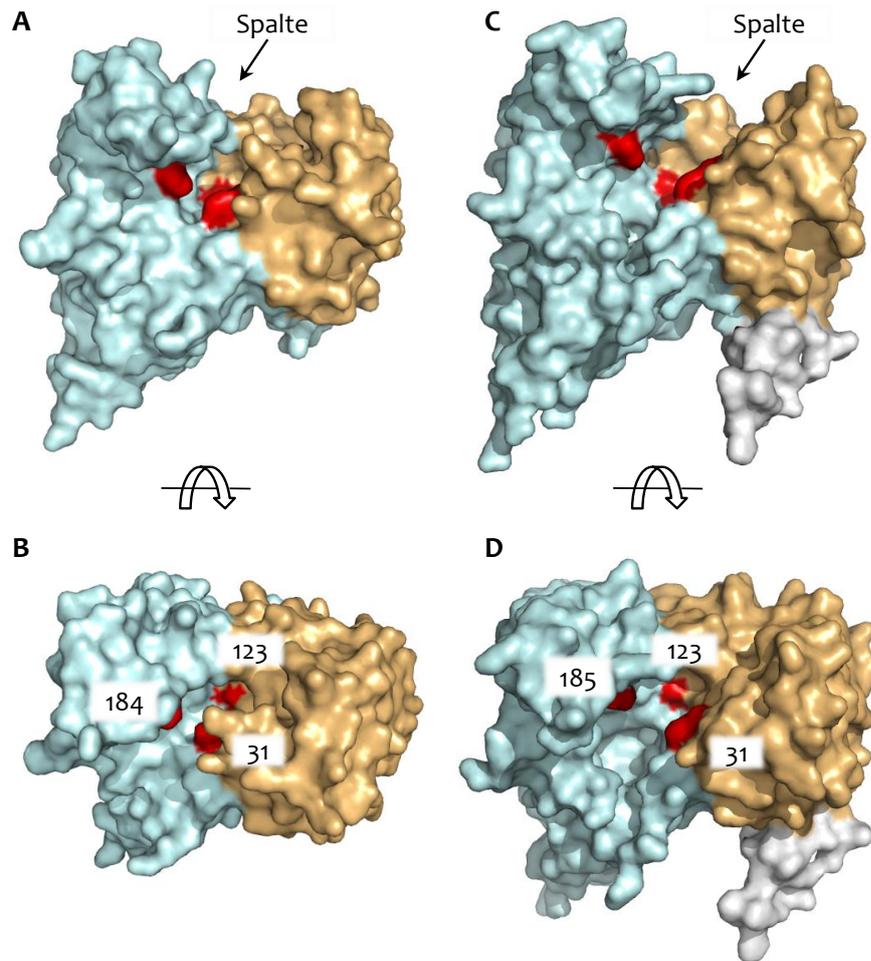


Abbildung 3. Lokalisation der Tryptophanreste in Gal80 aus *S. cerevisiae* (A-B) und *K. lactis* (C-D).

Gezeigt sind die Oberflächen der monomeren Kristallstrukturen von Gal80 aus *S. cerevisiae* (A-B) und *K. lactis* (C-D). Die β -Faltblatt-Dimerisierungsdomäne ist hellblau und die Rossmann-Falte sandfarben dargestellt. Die in der Spalte lokalisierten Tryptophanreste 31, 123 und 184 bzw. 185 sind rot gekennzeichnet. Der N-terminale Histidin-tag in KIGal80 ist grau dargestellt. Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 3BTU für ScGal80 und 2NVW für KIGal80) entnommen und mit dem Programm PyMol (DeLano) erstellt.

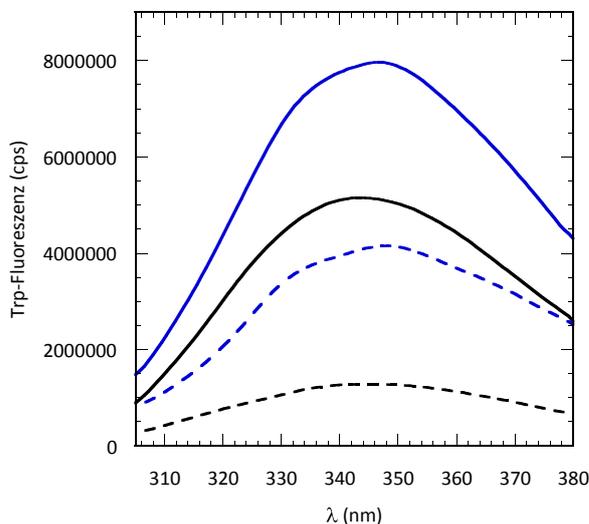


Abbildung 4. Fluoreszenzspektren von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

Korrigierte Fluoreszenzspektren von NHScGal80 in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 29 μ M NADP (- -) sowie von NHKIGal80 in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 1,5 mM NADP (- -). Emissionspektren wurden nach Anregung der Tryptophanfluoreszenz bei 295 nm in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgezeichnet. Die Konzentration an NHKIGal80 bzw. NHScGal80 betrug 1 μ M bzw. 1,5 μ M.

KIGal80 bindet Dinukleotide im millimolaren-Bereich. Hierbei war eine Korrektur der Tryptophanfluoreszenz vom dynamischen *quenching* (Fluoreszenzlöschung durch Kollision) notwendig, um den Teil der Tryptophanfluoreszenz zu erhalten, der aus dem statischen *quenching* (Fluoreszenzlöschung durch Bindung des Quencher) resultierte. Als Quencher handelte es sich um NAD bzw. NADP. Die dynamische Quenchkonstante wurde durch Titration von N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA) mit dem Quencher ermittelt, wobei sich eine lineare Abhängigkeit der Signalintensität von der Konzentration des Quenchers in der Stern-Volmer-Auftragung ergibt (Abbildung 5.A). Nach Korrektur der Fluoreszenzsignale von NHKIGal80 für das dynamische *quenching*, wurden die korrigierten Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Konzentration des Quenchers aufgetragen und die Dissoziationskonstante berechnet (Abbildung 5.B).

Anders als KIGal80 bindet ScGal80 Dinukleotide im mikromolaren-Bereich, weshalb eine Korrektur des dynamischen *quenching* nicht erforderlich war. In der Stern-Volmer-Auftragung trat eine stark negative Abweichung der Fluoreszenzsignale von der Linearität auf (Abbildung 6.A). Dieser Kurvenverlauf ist für das Quenchen einer dem Quencher zugänglichen und nicht-zugänglichen Klasse von Tryptophanresten im Protein charakteristisch. Mit Hilfe der modifizierten Stern-Volmer-Auftragung, kann der dem Quencher zugängliche Anteil an Tryptophanresten bestimmt und anschließend die Dissoziationskonstante der Protein-Liganden-Interaktion berechnet werden (Abbildung 6.B). Hierbei gilt je kleiner die ermittelte Dissoziationskonstante desto affiner ist die Gal80-Dinukleotid-Interaktion. Nach der Stern-Volmer-Gleichung ist mindestens ein Tryptophanrest von NHScGal80 dem Quencher zugänglich (Gleichung 3 unter 3.5.2). Für NHScGal80 wurde eine apparente Dissoziationskonstante von $2,5 \times 10^{-3}$ mM für die Bindung von NADP und $15,2 \times 10^{-3}$ mM für die Bindung von NAD ermittelt. Dagegen ist die NHKIGal80-NADP-Interaktion mit einem K_D -Wert von $2,1 \times 10^{-1}$ mM um den Faktor 120 bzw. die NHKIGal80-NAD-Interaktion mit einem K_D -Wert von $6,1 \times 10^{-1}$ mM um den Faktor 250 gegenüber der NHScGal80-NAD(P)-Interaktion signifikant weniger affin. Eine Analyse der Bindungsstärken für die reduzierten Dinukleotide mittels Fluoreszenzspektroskopie war aufgrund der starken Eigenfluoreszenz von NAD(P)H nur für NHScGal80 möglich. Für die NHScGal80-NADPH-Interaktion wurde ein K_D -Wert von $7,6 \times 10^{-3}$ mM ermittelt. Die Bindung von NADPH an ScGal80 ist somit um Faktor 3 gegenüber der Bindung von NADP schwächer.

Tabelle 1. Dissoziationskonstanten der Gal80-Dinukleotid-Interaktion.

Die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D der Gal80-Dinukleotid-Interaktion erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben. Nicht untersuchte Interaktionen sind durch (-) gekennzeichnet.

Gal80-Variante	K_D -Wert der Dinukleotid-Bindung (mM)			
	NAD	NADP	NADH	NADPH
NHScGal80	$15,2 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	-	$7,6 \times 10^{-3}$
NHKIGal80	$6,1 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-1}$	-	-
IHKIGal80	$7,5 \times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^{-1}$	-	-

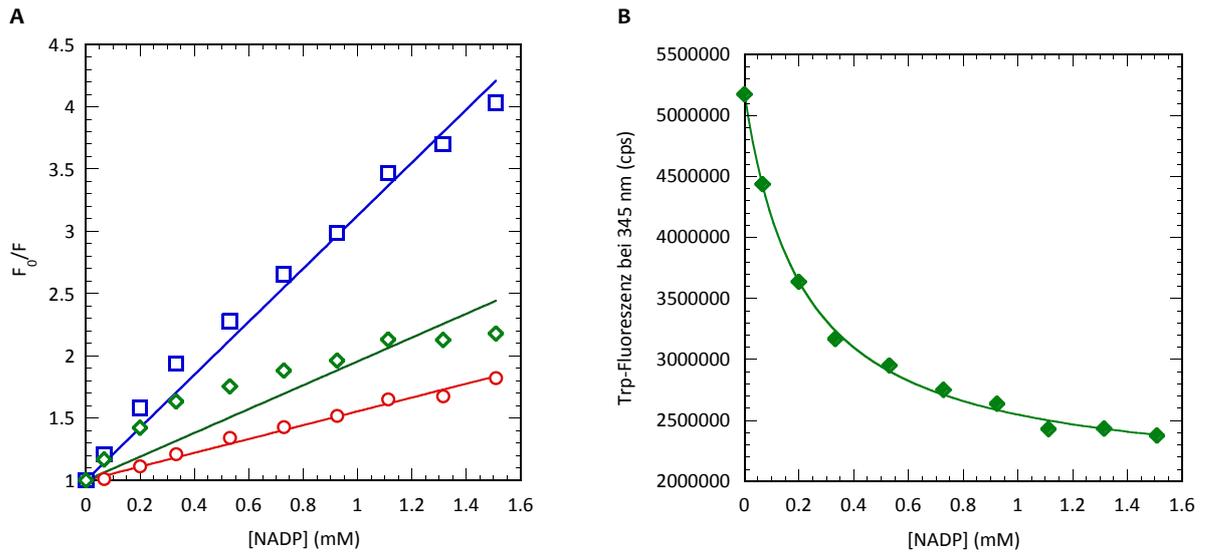


Abbildung 5. Tryptophanfluoreszenz von NATA und KIGal80 in Abhängigkeit von NADP.

A. Stern-Volmer-Auftragung der Tryptophanfluoreszenz (F_0/F) bei 345 nm von NATA (○), NHKIGal80 vor (□) und nach Korrektur für das dynamische *quenching* (◇) in Abhängigkeit von der millimolaren NADP-Konzentration. **B.** Plot der von dynamischen Quencheffekten korrigierten Fluoreszenzsignale bei 345 nm von NHKIGal80 (◆) in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration. Für die NHKIGal80-NADP-Interaktion wurde ein K_D -Wert von $2,1 \times 10^{-1}$ mM, wie unter 3.5.2 beschrieben, bestimmt. Fluoreszenzspektren wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgenommen. Die Konzentrationen an NATA bzw. NHKIGal80 betragen 1,5 μ M bzw. 1 μ M.

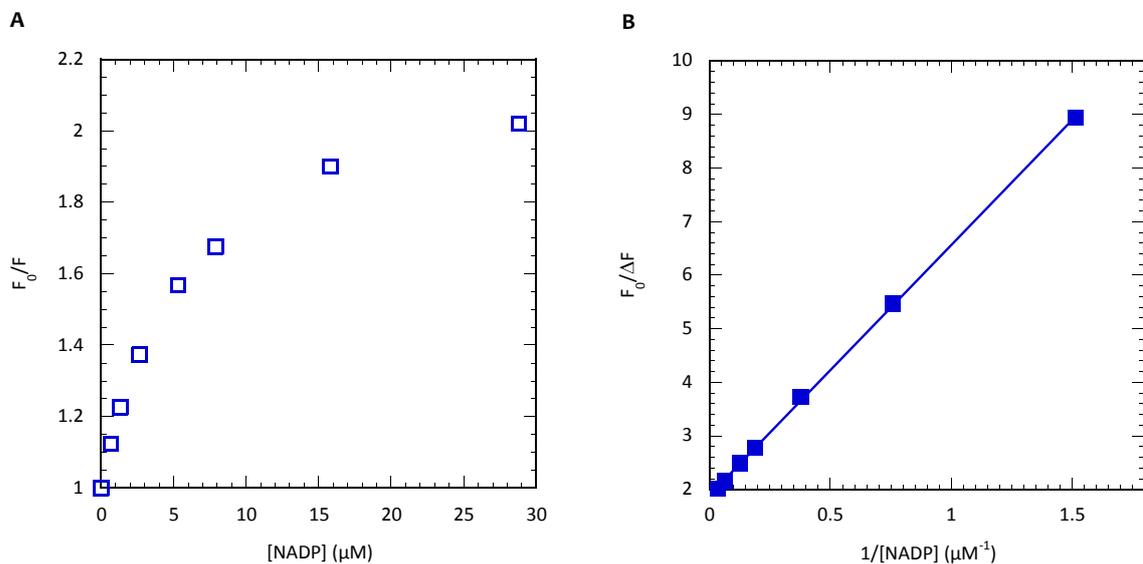


Abbildung 6. Tryptophanfluoreszenz von ScGal80 in Abhängigkeit von NADP.

A. Stern-Volmer-Auftragung der Tryptophanfluoreszenz (F_0/F) bei 347 nm von NHScGal80 (□) in Abhängigkeit von der mikromolaren NADP-Konzentration. **B.** Modifizierte Stern-Volmer-Auftragung der Tryptophanfluoreszenz ($F_0/\Delta F$) bei 347 nm von NHScGal80 (■) in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration. Die Berechnung des K_D -Wertes der NHScGal80-NADP-Interaktion von $2,5 \times 10^{-3}$ mM erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben. Nach der Stern-Volmer-Gleichung ist mindestens ein Tryptophanrest von NHScGal80 dem Quencher zugänglich. Fluoreszenzspektren wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgenommen. Die Konzentration an NHScGal80 betrug 1,5 μ M.

Die Analyse der Bindung der reduzierten Dinukleotide an NHKGal80 erfolgte mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie (3.5.5). Hierbei wird die Bindung direkt anhand der Reaktionswärme gemessen, die bei der Assoziation des Liganden mit seinem Bindungspartner frei wird. Durch Auswertung der Titrationskurve nach einem Einzentren-Bindungsmodell von NHKGal80 titriert mit NADP und NAD wurde eine Stöchiometrie der Bindung von 1:1 ermittelt (Tabelle 2, Abbildung 7.A und C). Dies bedeutet, dass ein Dinukleotidmolekül pro Molekül NHKGal80-Monomer gebunden ist. Für die NHKGal80-NADP-Interaktion wurde eine freie Enthalpie von $-20,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ und ein K_D -Wert von $2,0 \times 10^{-1} \text{ mM}$ ermittelt (Tabelle 2). Unter Annahme einer Stöchiometrie von 1:1 konnte für die NHKGal80-NADPH-Interaktion eine freie Enthalpie von $-16,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ und ein K_D -Wert von $11,6 \times 10^{-1} \text{ mM}$ bestimmt werden (Abbildung 7.D).

Eine negative freie Enthalpie gibt an, dass die beobachtete Reaktion exergon (spontan) abläuft und je kleiner der Wert umso bevorzugter läuft die Reaktion ab. Demnach ist die Bindung von NADP um $-4,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ gegenüber der Bindung von NADPH begünstigt. Die freie Enthalpie und die damit verbundene Bindungskonstante, aus der die Dissoziationskonstante berechnet werden kann, werden durch Enthalpie und Entropie bestimmt. Die Enthalpie gibt die Wärmetönung des gesamten Systems an, so dass nicht von Beiträgen, welche von der Protein-Ligand-Wechselwirkung und von anderen Prozessen (z.B. strukturelle und konformative Änderungen) verursacht sind, unterschieden werden kann. Eine negative Enthalpie gibt an, dass die beobachtete Reaktion exotherm (Freisetzung von Wärme) verläuft und je kleiner der Wert, desto begünstigter ist die Reaktion. Die Entropie umfasst, wie die Enthalpie, alle Beiträge des gesamten Systems und gilt als Maß für die erreichbaren Zustände von Molekülen in einem System. Die möglichen Zustände von Molekülen in einem System werden durch die Anzahl der Freiheitsgrade (Rotations-, Translations- und Schwingungsfreiheitsgrade) bestimmt. Vor der Bindung ist der Ligand frei beweglich und flexibel. Als Folge seiner Bindung an das Protein gehen Rotations- und Translationsfreiheitsgrade verloren, was zu einer Erniedrigung der Entropie führt und energetisch ungünstig für die Bindung ist (77). Zudem können Ligand und Protein unterschiedliche Konformationen im gebundenen Zustand einnehmen, was ebenfalls einen Einfluss auf die Entropie hat. Ungünstige Entropiebeiträge (negative Werte) können teilweise durch neue, niederfrequente und wärmeabsorbierende Schwingungen nicht-kovalenter Bindungen im Protein-Ligand-Komplex kompensiert werden (77). Desweiteren liegen Ligand und Protein vor der Bindung in einem solvatisierten Zustand vor. Hierbei sind einige Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Ligand bzw. Protein verknüpft und andere lose assoziiert. Die Anzahl an Wasserstoffbrücken, die durch die Protein-Ligand-Wechselwirkung gebrochen bzw. neu gebildet wird, beeinflusst Enthalpie und Entropie (77).

Für die NHKGal80-NAD bzw. -NADP-Interaktion wurde eine enthalpisch dominierte freie Enthalpie ermittelt (Tabelle 2). Dies bedeutet z.B. für die NHKGal80-NADP-Bindung, dass die beobachtete exergone Reaktion ($\Delta G^0 = -20,7 \text{ kJ mol}^{-1}$) aufgrund einer günstigen Enthalpie von $-29,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, trotz einer ungünstigen Entropie von $-29,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, abläuft. Die Bindung von NADPH an NHKGal80 läuft hingegen mit einer günstigen Enthalpie von $-4,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ und einer günstigen Entropie von $40,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ schlechter ab, was ebenfalls durch eine um den Faktor 6 geringere Affinität der NADPH-Bindung gegenüber der NADP-Bindung deutlich wird (Tabelle 2). Aufgrund der bereits geringeren Affinität für NAD konnte die Bindung von NADH unter den gewählten Bedingungen in der ITC-Messung nicht nachgewiesen werden (Abbildung 7.B).

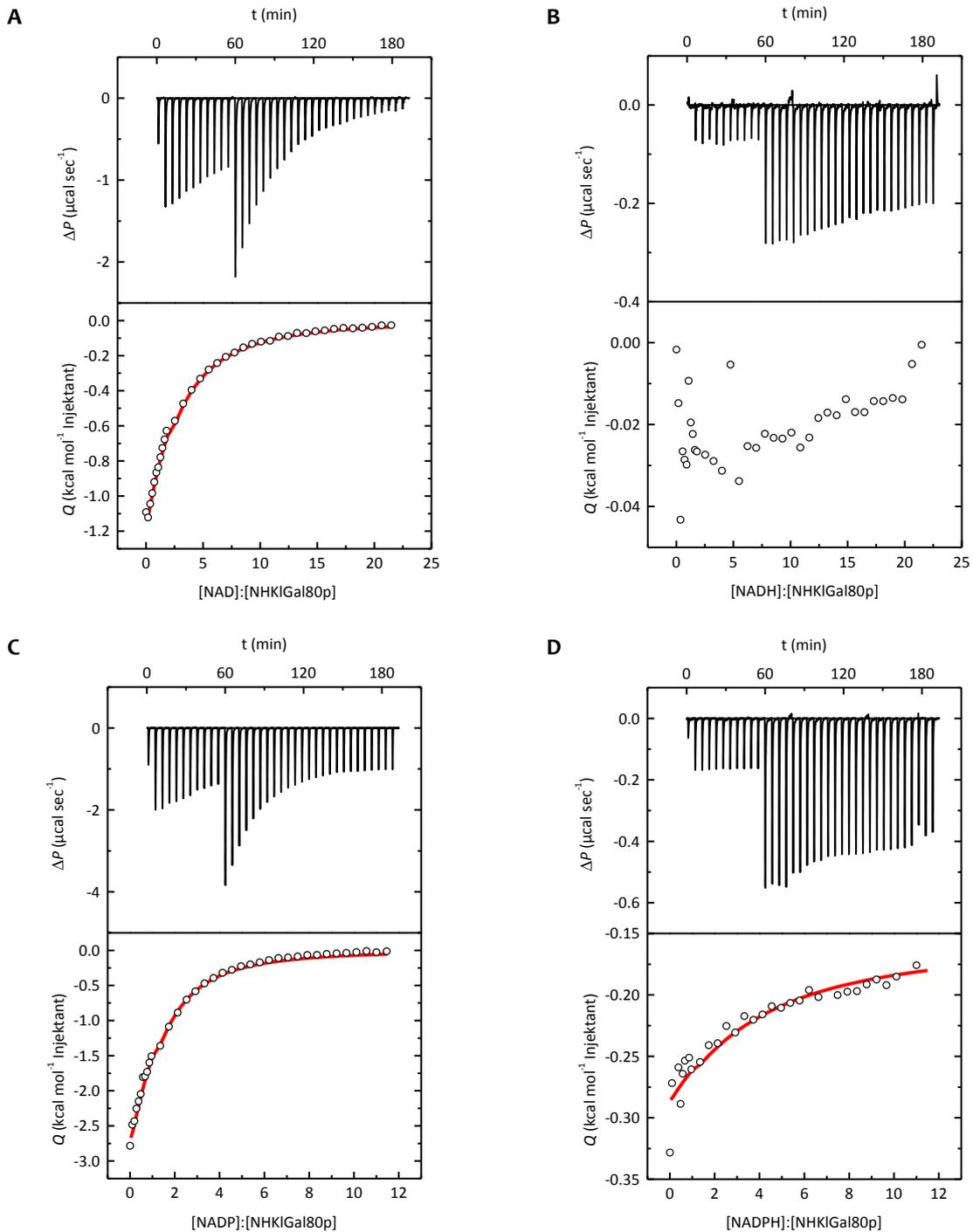


Abbildung 7. Isothermale Titrationskalorimetrie von KIGal80 mit Dinukleotiden.

A. Titration von 150 μM NHKIGal80 mit einer 15 mM NAD-Lösung. **B.** Titration von 150 μM NHKIGal80 mit einer 15 mM NADH-Lösung. **C.** Titration von 150 μM NHKIGal80 mit einer 8 mM NADP-Lösung. **D.** Titration von 150 μM NHKIGal80 mit einer 8 mM NADPH-Lösung. Im oberen Bild ist die von unspezifischen Wärmeeffekten korrigierte Heizleistung ΔP für jede Injektion von NAD(P)(H) ($1 \mu\text{l}$ Initialinjektion, $10 \times 2,5 \mu\text{l}$, $25 \times 10 \mu\text{l}$) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die resultierende Reaktionswärme Q der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion für jede Injektion von NAD(P)(H) ist in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis der Bindungspartner im unteren Bild dargestellt. ITC-Experimente wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C durchgeführt. Thermodynamische Parameter (Stöchiometrie N , Bindungskonstante K_B , Enthalpie ΔH^0) wurden durch Auswertung der Titrationskurve nach einem Einzentren-Bindungsmodell (—) ermittelt (Tabelle 2). Unter Annahme einer Stöchiometrie von 1:1 erfolgte die Auswertung der Titrationskurve von NHKIGal80 mit NADPH. Die berechneten K_B -Werte, Entropien ΔS^0 und freie Enthalpien ΔG^0 sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass beide Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* nicht nur NADP gegenüber NAD bevorzugt binden, sondern auch geringere Affinitäten für die reduzierten Dinukleotide gegenüber den oxidierten Dinukleotiden besitzen (Tabelle 1, Tabelle 2).

Tabelle 2. **Thermodynamische Parameter der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion.**

Bindungskonstante K_B , stöchiometrischer Faktor N und Enthalpie ΔH^0 wurden durch Auswertung der Titrationskurve nach einem Einzentren-Bindungsmodell bestimmt. Die Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante K_D , Entropie ΔS^0 und freien Enthalpie ΔG^0 erfolgte wie unter 3.5.5 beschrieben. ITC-Experimente wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C durchgeführt. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der NHKIGal80-NADPH-Interaktion erfolgte unter Annahme einer Stöchiometrie von 1:1[#]. (n. b. nicht bestimmbar).

Dinukleotid	Thermodynamische Parameter der NHKIGal80-Dinukleotid-Interaktion					
	K_B (mM ⁻¹)	K_D (mM)	N	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)
NAD	1,70 ± 0,10	5,9 × 10 ⁻¹	1,07 ± 0,17	-22,5 ± 3,8	-15,0 ± 12,6	-18,1 ± 0,1
NADP	4,88 ± 0,39	2,0 × 10 ⁻¹	0,87 ± 0,08	-29,4 ± 3,0	-29,7 ± 9,6	-20,7 ± 0,2
NADH	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
NADPH	0,86 ± 0,11	11,6 × 10 ⁻¹	1,00 ± 0,00 [#]	-4,6 ± 0,4	40,3 ± 0,3	-16,4 ± 0,3

4.2.1.2 Punktmutationen beeinflussen die Dinukleotid-Bindung von Gal80

Um die Rolle der Dinukleotid-Bindung zu klären, wurden gezielt Punktmutationen in der Rossmann-Falte von KIGal80 eingeführt. Diese Punktmutationen sollten die Dinukleotid-Bindung negativ beeinflussen oder ganz unterbinden. Die Aminosäure-Austausche wurden vor Veröffentlichung der Kristallstruktur aufgrund von Sequenz- und Strukturvergleichen von KIGal80 mit anderen Dinukleotid-bindenden Proteinen vorgenommen (63). Hierbei wurde die stärkste Sekundärstrukturhomologie für KIGal80 mit der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymonomas mobilis* gefunden. In der Ko-Kristallstruktur von ZmGFOR mit NADP befindet sich das Tryptophan 42 in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Liganden und scheint an dessen Bindung beteiligt zu sein (78). In KIGal80 befindet sich in entsprechender Position das Tryptophan 31, das gegen Glycin substituiert wurde. Das Glycin 24 in KIGal80, das dem zweiten Glycin in der konservierten Pyrophosphat-Bindeschleife (GXGXXG/A) entspricht, wurde gegen Valin substituiert. Dieses Glycin ist für die Dinukleotid-Bindung wichtig, da es über ein Wassermolekül Wasserstoffbrücken zum Dinukleotid vermittelt (79). Darüberhinaus wurden drei weitere einzelne Aminosäure-Austausche in der Rossmann-Falte vorgenommen, die eine starke Konservierung in Dinukleotid-bindenden Proteinen aufweisen (63). So wurde das Glutamat 122 gegen Glycin, das Histidin 99 gegen Leucin und das Aspartat 88 gegen Alanin substituiert. Da die eingeführten Mutationen G24V, D88A, H99L und E122G zwar Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, aber keinen Einfluss auf die Lage des Maximums der Tryptophanfluoreszenz hatten, konnte eine Konformationsänderung des Tryptophans ausgeschlossen werden und somit die Dinukleotid-Bindung der KIGal80-Varianten mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert werden (Anhang A1). Der Austausch des Tryptophans 31 führte zu einer verminderten Fluoreszenzintensität und zu einem hypsochrom, d.h. zu kürzeren Wellenlängen, verschobenen Maximum der

Tryptophanfluoreszenz bei 338 nm, das von mindestens einem von beiden Tryptophanresten in Position 123 und 185 resultierte (Anhang A1).

In der Stern-Volmer-Auftragung zeigt die Titration von NHKIGal80-W31G mit NAD ein vergleichbares Quenchverhalten wie NATA (Abbildung 8.A). Dieser Befund deutete darauf hin, dass es sich hierbei um dynamisches *quenching* handelt und keine Bindung von NAD an NHKIGal80-W31G detektierbar ist. Dies deutet daraufhin, dass das Tryptophan 31 als Reporter für die Dinukleotid-Bindung dient. Um zu analysieren, ob das Tryptophan 31 an der Dinukleotid-Bindung beteiligt ist, wurden Experimente mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie und analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt (4.2.2.1, 4.2.2.3). Hierbei konnte keine NADP-Bindung von NHKIGal80-W31G beobachtet werden. Demzufolge vermittelt das Tryptophan 31 die Dinukleotid-Bindung. Für NHKIGal80-G24V konnte in der Stern-Volmer-Auftragung eine schwache Abweichung im Vergleich zum *quenching* von NATA mit NAD beobachtet werden (Abbildung 8.A). Nach Korrektur für das dynamische *quenching*, für die Quantifizierung der Tryptophanfluoreszenz, welche durch statisches *quenching* bedingt ist, konnte jedoch keine NAD-Bindung von NHKIGal80-G24V, vergleichbar mit NHKIGal80-W31G, bestimmt werden (Abbildung 8.B). Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte aufgrund der geringen Affinität von NHKIGal80-H99L für NAD nur ein grober K_D -Wert von $40,6 \times 10^{-1}$ mM ermittelt werden, was eine 6fach schwächere Bindung gegenüber dem Wildtypprotein anzeigt. Für NHKIGal80-E122G konnte keine Bindung von NAD detektiert werden, wohin gegen die Substitution des Aspartats 88 keinen signifikanten Einfluss auf die NHKIGal80-D88A-NAD-Interaktion hatte (Tabelle 3).

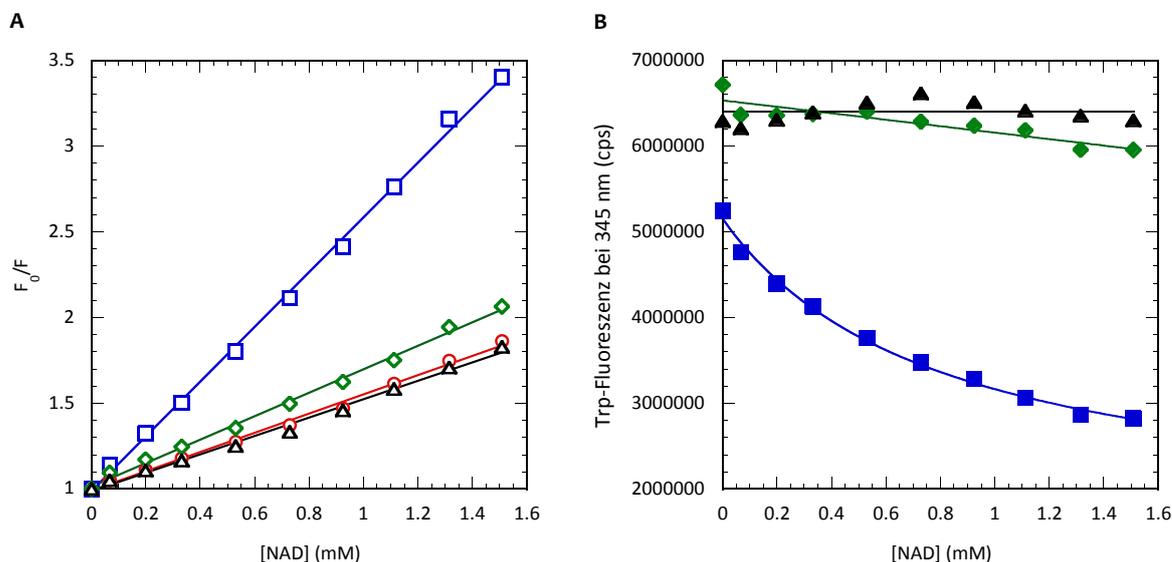


Abbildung 8. Tryptophanfluoreszenz von KIGal80 und der KIGal80-Varianten in Abhängigkeit von NAD.

A. Stern-Volmer-Auftragung der Tryptophanfluoreszenz (F_0/F) bei 345 nm von NATA (○), NHKIGal80 (□), NHKIGal80-G24V (◇) und NHKIGal80-W31G (△) in Abhängigkeit von der millimolaren NAD-Konzentration. **B.** Plot der von dynamischen Quencheffekten korrigierten Fluoreszenzsignale bei 345 nm von NHKIGal80 (■), NHKIGal80-G24V (◆) und NHKIGal80-W31G (▲) in Abhängigkeit von der millimolaren NAD-Konzentration. Für die NHKIGal80-NAD-Interaktion wurde ein K_D -Wert von $6,1 \times 10^{-1}$ mM, wie unter 3.5.2 beschrieben, bestimmt. Fluoreszenzspektren wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgenommen. Die Konzentrationen an NHKIGal80 bzw. NHKIGal80-G24V betragen 1 μ M, NHKIGal80-W31G 2 μ M und NATA 1,5 μ M.

Tabelle 3. Dissoziationskonstanten der NAD-Bindung der KIGal80-Varianten.

Die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben. Für NHKIGal80-H99L konnte nur ein grober K_D -Wert, aufgrund der geringen Affinität für NAD, ermittelt werden. (n. b. nicht bestimmbar).

KIGal80-Variante	K_D -Wert der NAD-Bindung (mM)
NHKIGal80	$6,1 \times 10^{-1}$
NHKIGal80-G24V	n. b.
NHKIGal80-W31G	n. b.
NHKIGal80-E122G	n. b.
NHKIGal80-H99L	$40,6 \times 10^{-1}$
NHKIGal80-D88A	$7,5 \times 10^{-1}$

Alle Aminosäure-Austausche, welche die Dinukleotid-Bindung negativ beeinflussen sind in der Spalte zwischen der β -Faltblatt-Dimerisierungsdomäne und der Rossmann-Falte in KIGal80 lokalisiert (Abbildung 9.B). Der Aspartat-Austausch, welcher die Dinukleotid-Bindung nicht beeinträchtigt, befindet sich zwar in der Rossmann-Falte, ist aber nicht in der Spalte lokalisiert (Abbildung 9.B). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Bindung des Dinukleotids in der Spalte von KIGal80 erfolgt. Für Gal80 aus *S. cerevisiae* konnte die Bindung von NAD in der Spalte durch Ko-Kristallisation gezeigt werden (Abbildung 16). Zwischen beiden Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* sind die in der Rossmann-Falte von KIGal80 mutierten Aminosäuren konserviert (Abbildung 9.A). Demnach ist es wahrscheinlich, dass ein Austausch der entsprechenden Aminosäuren in ScGal80 ebenfalls die Dinukleotid-Bindung beeinträchtigen bzw. unterbinden kann.

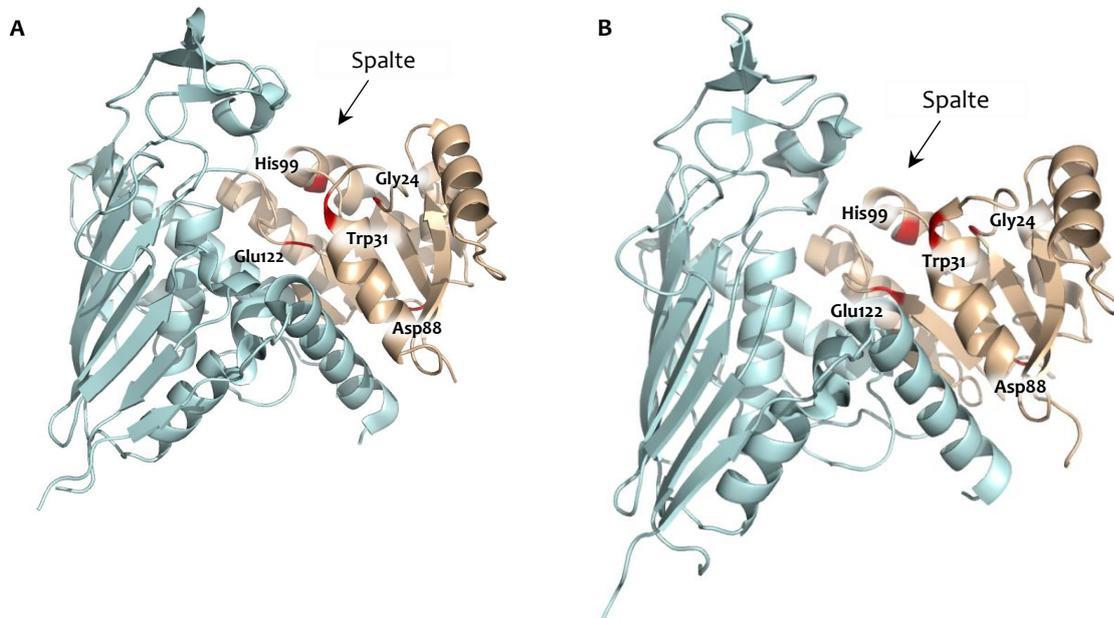


Abbildung 9. Lokalisation der Mutationen in Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

Dargestellt ist die Kristallstruktur des (A) ScGal80 - und (B) KIGal80 -Monomers. Die β -Faltblatt-Dimerisierungsdomäne ist hellblau und die Rossmann-Falte sandfarben dargestellt. Die in der Spalte lokalisierten Mutationen in KIGal80 sowie die homologen Aminosäurereste in ScGal80 sind rot gekennzeichnet und nach der Position in der Aminosäuresequenz nummeriert. Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 3BTU für ScGal80 und 2NVW für KIGal80) entnommen und mit dem Programm PyMol (DeLano) erstellt.

4.2.2 Strukturelle Untersuchungen der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion

4.2.2.1 Konformationsänderung von NADP durch Interaktion mit KIGal80

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Untersuchung der Gal80-Dinukleotid-Interaktion zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie und isothermaler Titrationskalorimetrie beschrieben. Um strukturelle Änderungen in KIGal80 durch die Dinukleotid-Bindung nachzuweisen, wurden Messungen mit Hilfe der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie vorgenommen. Die CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch chirale (optisch aktive) Strukturen. Da es sich bei Dinukleotiden um chirale Moleküle handelt, wurde die Dinukleotid-Bindung von NHKIGal80 durch Aufnahme von CD-Spektren im Nah-UV-Vis Bereich von 290 bis 500 nm untersucht. Proteine enthalten ebenfalls chirale Strukturen. So treten im Nah-UV Bereich (250-300 nm) CD-Signale der aromatischen Aminosäuren auf. Disulfidbrücken absorbieren sehr schwach bei 250 nm. Erfolgt keine Absorption von zirkular polarisiertem Licht, so tritt kein Zirkulardichroismus auf.

Für nicht-gebundenes NADP wurde eine positive Elliptizität im Bereich von 290 bis 370 nm in Puffer aufgezeichnet. In Gegenwart von NHKIGal80 konnte hingegen eine positive Elliptizität im Bereich von 300 bis 410 nm beobachtet werden (Abbildung 10.A). Hierbei überlagerten sich die aufgezeichneten CD-Spektren in einem Punkt bei 335 nm. In Abbildung 10.B sind die korrigierten molaren CD-Spektren der Titration von NHKIGal80 mit NADP dargestellt, die sich ebenfalls bei 335 nm in einem sogenannten isodichroischen Punkt schneiden. Ein isodichroischer Punkt beschreibt die Wellenlänge bei der der Zirkulardichroismus der nebeneinander vorliegenden und ineinander umwandelbaren Spezies eines optisch aktiven Moleküls gleich ist. Demzufolge nimmt das NADP-Molekül durch bzw. für die Interaktion mit KIGal80 eine andere Konformation ein und weist einem zum nicht-gebundenen NADP-Molekül veränderten Zirkulardichroismus auf.

Für NHKIGal80-W31G, für das keine Dinukleotid-Bindung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen konnte, zeigte die Titration mit NADP keinen Zirkulardichroismus (Abbildung 10.C). Die Titration von NHKIGal80-G24V und -E122G mit NADP, für welche keine Dinukleotid-Bindung nachgewiesen werden konnte, zeigten ebenfalls keinen Zirkulardichroismus (Daten hier nicht gezeigt). Somit kann durch die CD-spektroskopische Analyse eine Dinukleotid-Bindung von NHKIGal80-W31G ausgeschlossen werden, was ebenfalls durch analytische Ultrazentrifugationsexperimente bestätigt werden konnte (4.2.2.3). NHKIGal80-H99L bindet Dinukleotide mit geringerer Affinität als NHKIGal80 (Tabelle 3). Entsprechend zeigte die Titration von NHKIGal80-H99L mit NADP einen schwächeren Zirkulardichroismus im Vergleich zum Wildtypprotein (Abbildung 10.D). Dagegen zeigte die Titration der nicht in der Dinukleotid-Bindung beeinträchtigten Variante NHKIGal80-D88A mit NADP einen mit dem Wildtypprotein vergleichbaren Zirkulardichroismus (Daten hier nicht gezeigt).

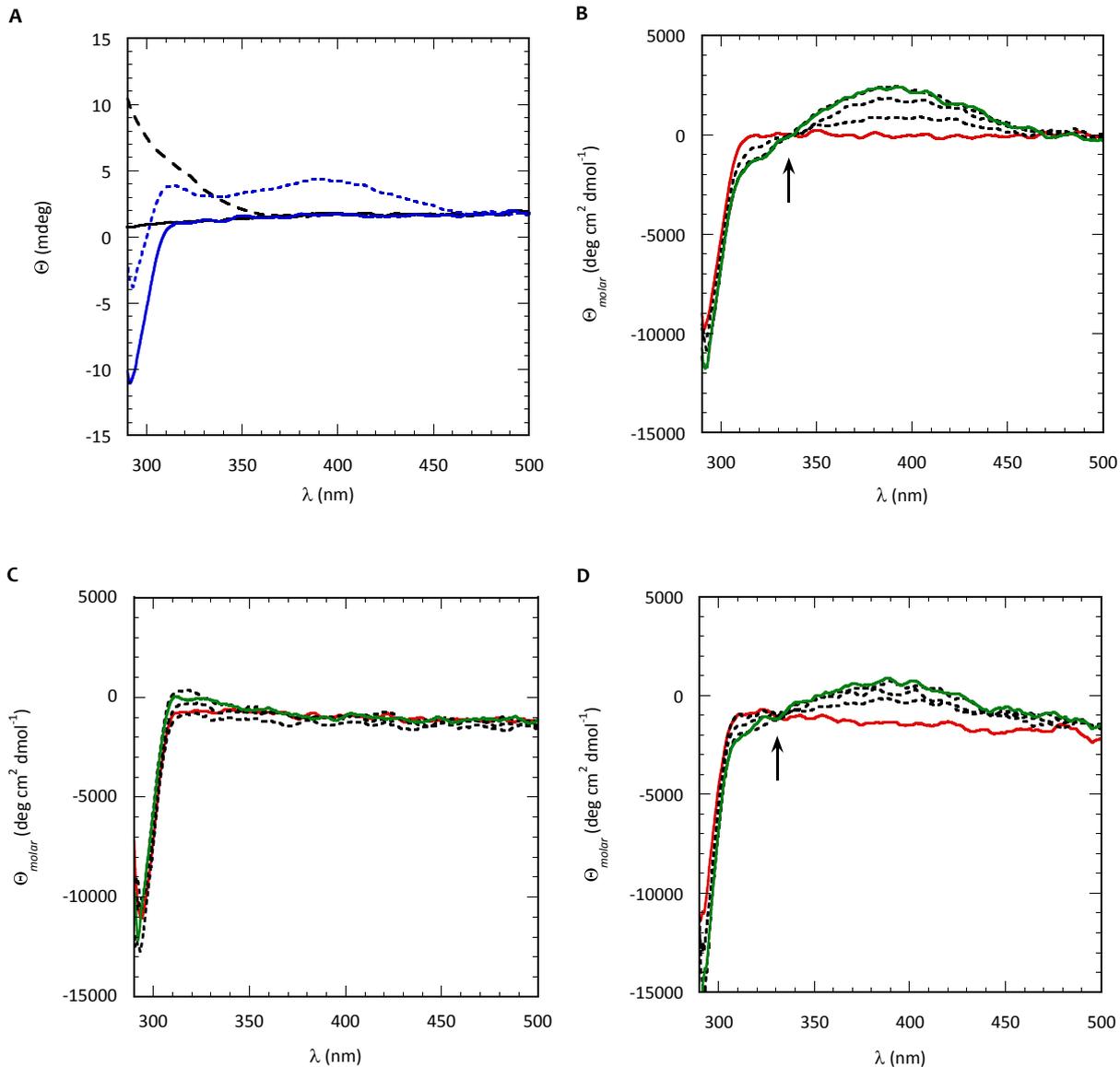


Abbildung 10. Nah-UV-Vis CD-Spektren von KIGal80 titriert mit NADP.

A. Elliptizitäten von Puffer (—), 1,0 mM NADP in Puffer (- -), NHKIGal80 in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 1,0 mM NADP (- -). **B.** Korrigierte molare Elliptizität von NHKIGal80 titriert mit NADP. **C.** Korrigierte molare Elliptizitäten von NHKIGal80-W31G titriert mit NADP. **D.** Korrigierte molare Elliptizitäten von NHKIGal80-H99L titriert mit NADP. Nah-UV-Vis CD-Spektren im Bereich von 290 bis 500 nm wurden in Abwesenheit (—), mit zunehmender Konzentration (0,2, 0,5 und 1,0 mM) (- -) und in Gegenwart von 1.4 mM NADP (—) in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgezeichnet. Die Konzentration an NHKIGal80, NHKIGal80-W31G und NHKIGal80-H99L betrug 120 μM. (→) isodichroische Punkt bei 335 nm.

4.2.2.2 Dinukleotid-Bindung hat keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur von KIGal80

Im Fern-UV Bereich (170-250 nm), der sogenannten Amid-Region, absorbieren Peptid-Bindungen von Peptiden und Proteinen zirkular polarisiertes Licht. Fern-UV CD-Spektren enthalten Informationen über die Peptid-Bindungen und Sekundärstruktur-Elemente von Proteinen. Da mit Hilfe von Fern-UV CD-Spektren Änderungen in der Sekundärstruktur im Verlauf von strukturellen Übergängen (z.B. Proteinfaltung, Konformationsänderungen bei Bindung von Substrat oder Ligand) verfolgt

werden können, wurden CD-Spektren im Bereich von 190 bis 250 nm von NHKIGal80 in Abwesenheit und Anwesenheit von NADP aufgenommen.

Aufgrund der starken Absorption von EDTA wurden die Fern-UV CD-Spektren in Abwesenheit von EDTA aufgenommen. Da EDTA die dimere Form von KIGal80 stabilisiert, musste ausgeschlossen werden, dass das Entfernen von EDTA aus dem Puffer keinen negativen Einfluss auf die Oligomerisierung von KIGal80 hat. Hierzu wurden Experimente mittels analytischer Gelfiltration durchgeführt. Es handelt sich um eine chromatographische Trennmethode bei der die Trennung von Molekülen nach der Größe in einer porösen Gelmatrix erfolgt. Durch eine Kalibrierung der Gelmatrix mit Eichproteinen kann anhand der Retentionszeit der zu analysierenden Proteine oder Komplexe auf deren Größe geschlossen werden. Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration konnte nach dem Entfernen von EDTA aus der Lösung von NHKIGal80 ein Peak detektiert werden, welcher der dimeren Form mit einer apparenten Molekülmasse von 107 kDa zugeordnet werden konnte (Abbildung 11). Durch analytische Ultrazentrifugationsexperimente konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NHKIGal80 nach dem Entfernen von EDTA als Dimer vorliegt (Daten hier nicht gezeigt, persönliche Mitteilung Dr. Hauke Lilie).

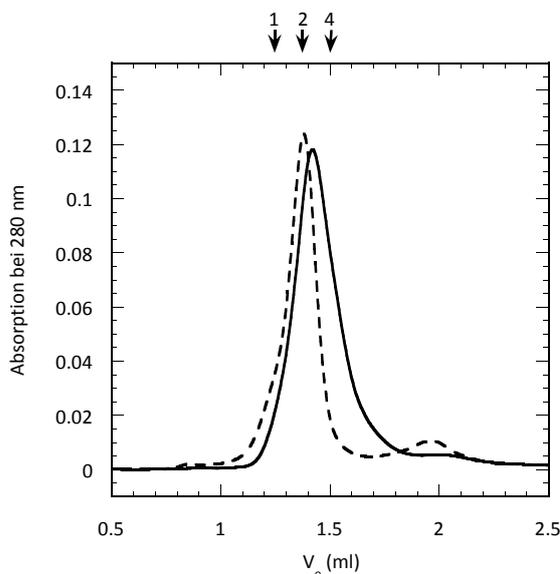


Abbildung 11. **Analytische Gelfiltration von KIGal80.**

Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration von NHKIGal80 in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.2 ohne (---) bzw. mit 60 mM EDTA (—) bei 20°C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 7 μ M. Der Peak im Elutionsprofil entspricht der dimeren Form von NHKIGal80. Zur Orientierung sind die theoretisch erwartenden Elutionsvolumina für monomeres (1), dimeres (2) und tetrameres (4) NHKIGal80 in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.2 bei 20°C über dem Diagramm markiert.

Das Fern-UV CD-Spektrum von NHKIGal80 wird von α -helikalen Anteilen im Protein dominiert (Abbildung 12). Hierbei traten bei 208 und 222 nm die charakteristischen negativen Extrema für α -helikale Strukturen auf (80). Die dritte für α -helikale Strukturen charakteristische Bande bei 190 nm kann nicht eindeutig zugeordnet werden, da das Spektrum im Bereich von 190 bis 196 nm ein schlechtes Signal/Rauschverhältnis aufweist und an der oberen Grenze der Detektion lag. Die Fern-UV CD-Spektren von NHKIGal80 in Abwesenheit und Anwesenheit von NADP überlagerten sich (Abbildung 12). Somit konnte keine Änderung der Sekundärstruktur im Bereich von 190 bis 250 nm von NHKIGal80 durch die Bindung von NADP beobachtet werden. Für IHKIGal80 konnte ebenfalls keine Änderung der Sekundärstruktur als Folge der Dinukleotid-Bindung im Fern-UV Bereich aufgezeichnet werden (Daten hier nicht gezeigt). Dennoch kann anhand der Fern-UV CD-Spektren eine konformative Änderung der Struktur durch die Dinukleotid-Bindung nicht ausgeschlossen werden, da mit dieser Methode nicht die Sekundärstruktur im Wellenlängenbereich unterhalb von 190 nm detektiert werden kann. Durch Messung des Zirkulardichroismus mit Hilfe von

Synchrotronstrahlung (SRCD) können Spektren mit einem besseren Signal/Rauschverhältnisses im Fern-UV und darüberhinaus im Vakuum-UV (<190 nm) Bereich aufgenommen werden (81). Mittels SRCD ist es möglich kleine Änderungen der Sekundärstruktur sowie Änderungen der Tertiärstruktur im Vakuum-UV Bereich zu detektieren (82–84).

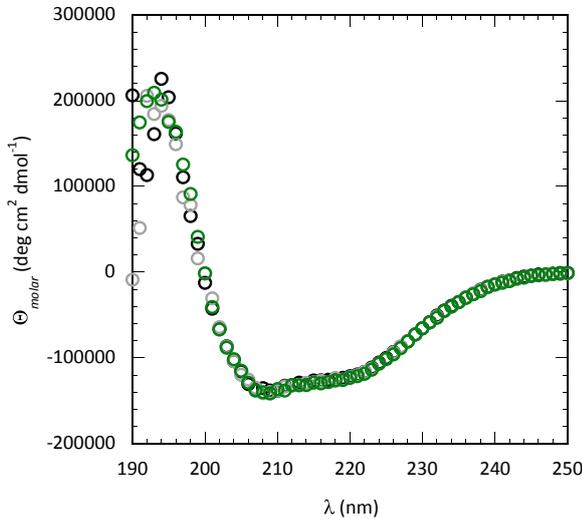


Abbildung 12. Fern-UV CD-Spektren von K1Gal80 titriert mit NADP.

Molare Elliptizität im Bereich von 190 bis 250 nm von NHK1Gal80 titriert mit NADP. Fern-UV CD-Spektren in Abwesenheit (○), in Anwesenheit von 0,6 mM (○) und 1,2 mM NADP (○) wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8.2 bei 20°C aufgezeichnet. Die Konzentration an NHK1Gal80 betrug 50 µM.

Durch Aufnahme von Fern-UV CD-Spektren konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Position der Histidin-Markierung einen Einfluss auf die Intensität der Elliptizität hat (Abbildung 13.A). Da aber Spektrenform und Lage der lokalen Extrema nicht verändert sind, kann ausgeschlossen werden, dass die Gesamtsekundärstruktur des Proteins in Abhängigkeit von der Position der Histidin-Markierung beeinträchtigt ist. Die in der IHK1Gal80-Variante verringerte Intensität der Elliptizität im Vergleich zu NHK1Gal80 resultiert wahrscheinlich aus einem veränderten α -helikalen Anteil im Protein. Die Einführung von Aminosäure-Austauschen in der Rossmann-Falte zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die Intensität der Elliptizität, aber nicht auf die Gesamtsekundärstruktur (Abbildung 13.B).

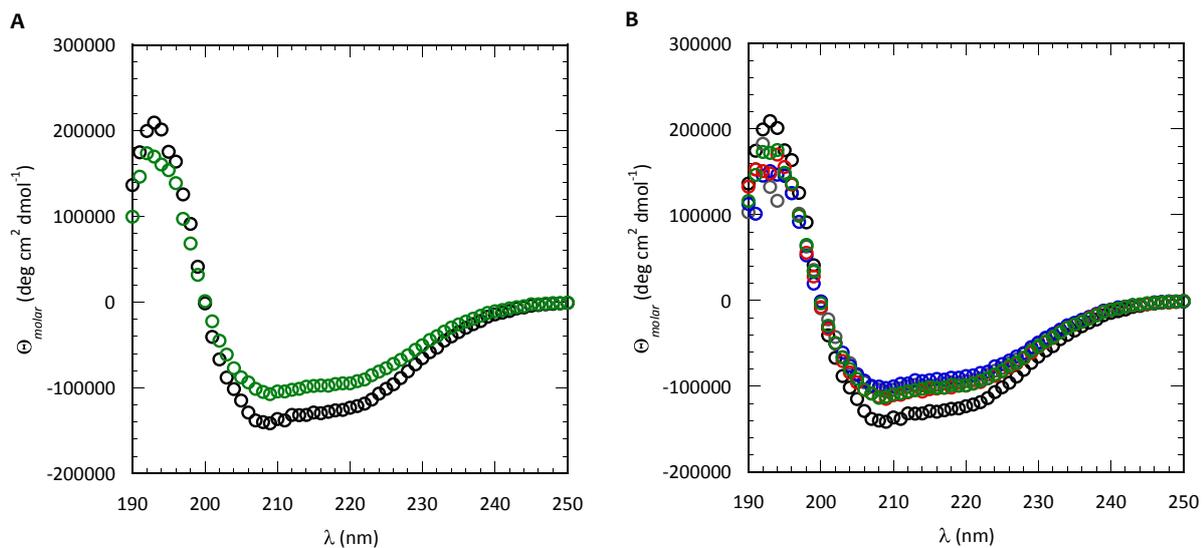


Abbildung 13. Fern-UV CD-Spektren der K1Gal80-Varianten.

A. Molare Elliptizität von N-terminal (○) und intern (○) Histidin-markiertem K1Gal80. **B.** Molare Elliptizität von NHK1Gal80 und der Varianten NHK1Gal80-D88A (○), -G24V (○), -H99L (○), -W31G (○). Fern-UV CD-Spektren im Bereich von 190 bis 250 nm wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8.2 bei 20°C aufgezeichnet. Die Konzentration an K1Gal80 betrug 50 µM.

4.2.2.3 Punktmutation in KIGal80 hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Dinukleotid-Bindung keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur von KIGal80 hat. Desweiteren konnte kein signifikanter Einfluss der Aminosäure-Austausche in KIGal80 auf die Gesamtsekundärstruktur festgestellt werden. KIGal80 besitzt wie ScGal80 die Fähigkeit zur Oligomerisierung (4; 33; 40). Aus der Literatur sind Beispiele bekannt, dass der Grad der Oligomerisierung von Proteinen durch die Bindung von Nukleotiden beeinflusst werden kann (85; 86). Für ScGal80 wurde gezeigt, dass die Dimerisierung die ScGal4-ScGal80-Interaktion sowie die Bindung von ScGal4 an die DNA in einem (ScGal4)₂-(ScGal80)₂-DNA-Komplex stabilisiert (4). Tetramerisierung ist möglicherweise Voraussetzung für eine stärkere Repression von GAL-Genen mit mindestens zwei Gal4-Bindestellen im Promotor. Jedoch sind die Kontaktstellen der Dimer-Dimer-Interaktion unbekannt. Untersuchungen mit Hilfe der analytischen Gelfiltration zeigten, dass das KIGal80-Dimer gegenüber der monomeren und tetrameren Form durch Citrat und EDTA stabilisiert wird (33). Derzeit gibt es keine Hinweise, dass eine tetramere Form von KIGal80 in der Zelle vorliegt (71).

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle (Saale)) untersucht, ob die Dinukleotid-Bindung Einfluss auf den Grad der Oligomerisierung hat und zu einer Tetramerisierung von KIGal80 führt. Bei dieser Methode wird das Sedimentationsverhalten von Partikeln aufgrund eines Gravitationsfeldes untersucht. Hierbei können Molekülmassen in einem Sedimentationsgleichgewichts-Experiment und Sedimentationskoeffizienten in einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment bestimmt werden. Beim Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment werden Sedimentationsgeschwindigkeiten von Partikeln in einem starken Zentrifugalfeld untersucht, woraus Sedimentationskoeffizienten ermittelt werden können. Eine Sedimentationskoeffizienten-Verteilung gibt Auskunft über die Anzahl der Partikel, Homogenität und auftretende Aggregate in einer Probe. Da die Sedimentationskonstante eines Partikels u.a. von dessen Molekulargewicht abhängig ist, kann anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit die Molekülmassenverteilung in einer Probe ermittelt werden. Dagegen kann in einem Sedimentationsgleichgewichts-Experiment die genaue Molekülmasse von Partikeln ermittelt werden. Die Bestimmung der Molekülmassen erfolgt, nachdem sich in einem schwachen Zentrifugalfeld ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Rückdiffusion vom Zellboden und Sedimentation zum Zellboden eingestellt hat.

In Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten konnte für NHKIGal80 in Anwesenheit und Abwesenheit von 0,6 mM NADP kein höherer Assoziationsstand als die dimere Form detektiert werden. Die ermittelte apparente Molekülmasse von $107 \pm 3,5$ kDa entsprach der theoretischen Molekülmasse für das NHKIGal80-Dimer von 107 kDa. Der anhand der Änderung der Amplitude in einem Sedimentationsgleichgewichts-Experiment ermittelte K_D -Wert der NHKIGal80-NADP-Interaktion von $1,7 \times 10^{-1}$ mM korrelierte mit den bereits durch Fluoreszenzspektroskopie und ITC-Messungen ermittelten Dissoziationskonstanten (Tabelle 1). Für NHKIGal80-W31G konnte in einem gleichen Experiment keine Dinukleotid-Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 14). Desweiteren hat der Aminosäure-Austausch in der Rossmann-Falte keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Dimerisierung (persönliche Mitteilung PD Dr. Hauke Lilie).

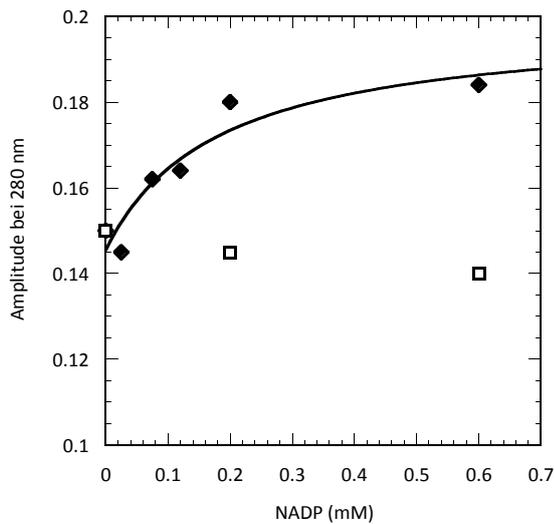


Abbildung 14. Analytische Ultrazentrifugation von KIGal8o und KIGal8o-W31G titriert mit NADP.

Amplitude bei 280 nm von NHKIGal80 (◆) und NHKIGal80-W31G (□) in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration. Für die NHKIGal80-NADP-Interaktion wurde ein K_D -Wert von $1,7 \times 10^{-1}$ mM bestimmt. Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C durchgeführt. Die Konzentration an NHKIGal80 und NHKIGal80-W31G betrug 5 μ M.

4.2.3 Kinetische Untersuchungen der Gal8o-Dinukleotid-Interaktion

4.2.3.1 Dinukleotid-Bindung induziert Konformationsänderung in KIGal8o

Durch CD-spektroskopische Analysen konnte kein Einfluss der Dinukleotid-Bindung auf die KIGal80 Sekundärstruktur gezeigt werden. Darüberhinaus sind aber kleinere konformative Übergänge im Protein, die mit dieser Methode nicht detektiert werden können, nicht ausgeschlossen. Ein Ligand der an ein Protein bindet induziert häufig eine Konformationsänderung des Proteins, die die Bindungsstelle optimiert (*induced-fit*) (87). Solch ein *induced-fit* kann z.B. durch kinetische Analysen nachgewiesen werden. Bilden Protein (P) und Ligand (L) in einem einzigen Schritt einen Protein-Liganden-Komplex (PL), kann dies durch eine einfache reversible Reaktion zweiter Ordnung beschrieben werden (Gleichung 8). Bilden Protein und Ligand in einem ersten Schritt einen intermediären Komplex (P-L) und im zweiten Schritt den stabilen Protein-Liganden-Komplex (PL), kann dies durch Gleichung 9 beschrieben werden. Ist bei solch einer biphasischen Kinetik die zweite Phase von der Ligandenkonzentration unabhängig, kann diese Phase dem *induced-fit* zugeordnet werden.



Die Analyse der Kinetik der KIGal80-Dinukleotid-Interaktion erfolgte durch *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ralph P. Golbik (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle (Saale)). Aufgrund der starken Absorption von EDTA wurde für die Aufnahme der *stopped-flow*-Kinetiken das EDTA aus dem Puffer entfernt. Einen negativen Einfluss auf den Dimerstatus von KIGal80 konnte durch Untersuchungen mit Hilfe der analytischen Gelfiltration und analytischen Ultrazentrifugation, wie unter 4.2.2.2 beschrieben, ausgeschlossen werden.

Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und nach Mischen von Protein- und Dinukleotid-Lösung bei 340 nm detektiert (Abbildung 15.A). Für NAD und NADP wurde ein biphasischer Verlauf der *stopped-flow*-Kinetik mit einer sehr schnellen ersten Phase ($k_1=10\text{ s}^{-1}$ für NAD und $k_1=7\text{ s}^{-1}$ für NADP) und einer zweiten langsamen Phase ($k_2=0,15\text{ s}^{-1}$ für NAD und $k_2=0,1\text{ s}^{-1}$ für NADP) aufgezeichnet. Beide Phasen sind von der Dinukleotidkonzentration unabhängig (Abbildung 15.B). Die schnelle Phase ist nur dann von der Dinukleotidkonzentration unabhängig, wenn $k_1 \gg k_{-1}$ gilt. Die zweite langsame Phase kann als Konformationsänderung des Proteins (*induced-fit*), z.B. durch Bewegung einer α -Helix einschließlich der Pyrophosphat-Bindeschleife, interpretiert werden. Beim Vergleich der Kristallstrukturen des zu KIGal80 homologen Gal80 aus *S. cerevisiae* mit und ohne NAD kann solch eine Änderung der Tertiärstruktur durch die Dinukleotid-Bindung gezeigt werden (Abbildung 16). Durch Auswertung der Endwerte der *stopped-flow*-Kinetiken konnten eine Dissoziationskonstante für die NAD-Bindung mit $7,4 \times 10^{-1}\text{ mM}$ und für die NADP-Bindung mit $2,6 \times 10^{-1}\text{ mM}$ bestimmt werden, welche mit den bereits ermittelten K_D -Werten gut übereinstimmen (Anhang A2).

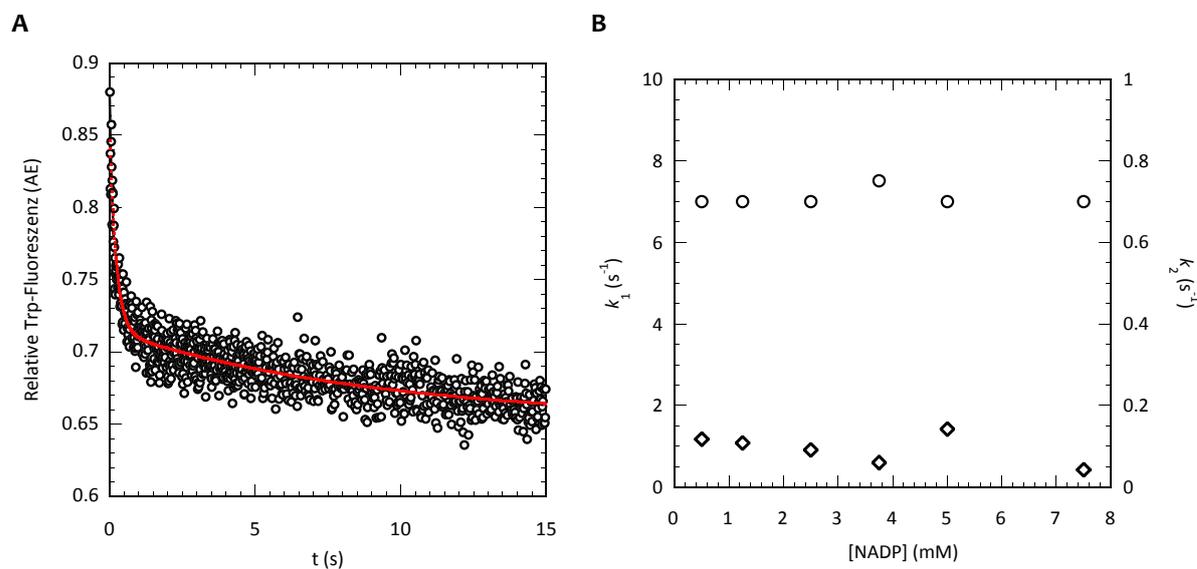


Abbildung 15. *Stopped-flow*-Kinetik der NADP-Bindung von KIGal80.

A. *Stopped-flow*-Kinetik von NHKIGal80 mit NADP. Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei 340 nm, nach Anregung bei 295 nm direkt nach dem Mischen von NHKIGal80 mit sechs verschiedenen NADP-Konzentrationen im Verhältnis 1+1 gemessen. Die Daten wurden nach einer doppelt-exponentiellen Funktion 1. Ordnung ausgewertet. **B.** Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der NADP-Konzentration. Für beide Phasen wurde je eine von der Dinukleotidkonzentration unabhängige Geschwindigkeitskonstante, $k_1=7\text{ s}^{-1}$ für die schnelle Phase (O) und $k_2=0,1\text{ s}^{-1}$ für die langsame Phase (◇), ermittelt. *Stopped-flow*-Kinetiken wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8.2 bei 20°C aufgenommen.

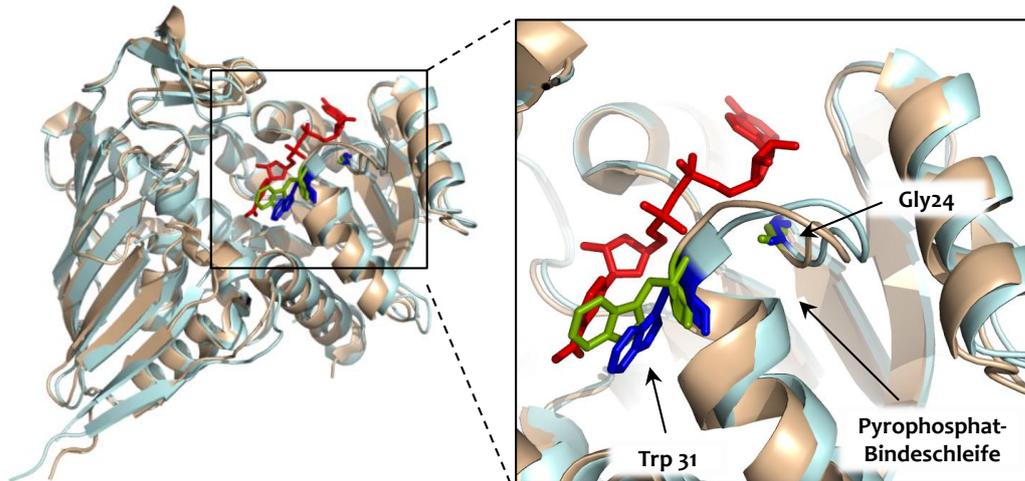


Abbildung 16. Möglicher *Induced-fit* der NAD-Bindung von Gal80 aus *S. cerevisiae*.

Alignment der Kristallstrukturen der ScGal80-Monomere ohne NAD (sandfarben, Trp 31 und Gly 24 sind grün hervorgehoben) und mit ko-kristallisiertem NAD (hellblau, Trp 31 und Gly 24 sind dunkelblau hervorgehoben). ScGal80 nimmt eine durch den Liganden induzierte optimierte Konformation (*induced-fit*) ein. NAD (rot) und das in die Dinukleotid-Bindung involvierte Tryptophan 31 und Glycin 24 sind als *sticks* dargestellt. Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 3BTU und 3BTS) entnommen und mit dem Programm PyMol (DeLano) erstellt.

4.2.4 Einfluss des Liganden auf die Gal4/Gal1-Gal80-Interaktion

4.2.4.1 Unterschiedlicher Einfluss von AD-22 auf die Gal80-NAD(P)-Interaktion

Aus vorangegangenen Arbeiten sind Mutationen in Gal80 aus *S. cerevisiae* bekannt, die die Interaktion mit Gal4 beeinträchtigen (32; 88). Betrachtet man die Lokalisation der zu ScGal80 homologen Mutationen in KIGal80, so sind diese in der Spalte sowie in deren Nähe lokalisiert. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Transaktivierungsdomäne (TAD) von Gal4 in der Spalte von KIGal80 gebunden wird (89). Da die Dinukleotid-Bindung ebenfalls in der Spalte in Gal80 erfolgt, sollte untersucht werden, ob sich Dinukleotid-Bindung und die Bindung der Gal4-TAD gegenseitig beeinflussen. Hierfür wurde die Dinukleotid-Bindung von Gal80 in Anwesenheit eines KIGal4-Peptids (AD-22) mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (3.5.2). Bei diesem KIGal4-Peptid handelt es sich um ein synthetisches Peptid mit der Sequenz der 22 C-terminalen Aminosäuren (AA 844-865) der TAD von Gal4 aus *K. lactis* (3.1.4). Die Sequenz des synthetischen Peptids enthält einen Bereich, der zwischen den homologen Gal4 aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* hoch konserviert ist und von beiden Gal80 gebunden wird (Abbildung 17) (23–26).

Für NHKIGal80 wurde in Gegenwart von AD-22 eine schwächere Bindung von NAD um den Faktor 2,5 und von NADP um den Faktor 4,5 ermittelt (Tabelle 4). Die Bindung von AD-22 hat ebenfalls einen negativen Einfluss (Faktor 3,9) auf die NHScGal80-NADP-Interaktion (Tabelle 4). Dagegen ist die Interaktion von NHScGal80 mit NAD durch die Bindung von AD-22 nicht beeinträchtigt. Vielmehr scheint diese Interaktion in Gegenwart des KIGal4-Peptids verbessert zu sein (Tabelle 4). Hierbei handelt es sich zwar um einen schwachen, aber um einen in mehreren unabhängigen Experimenten reproduzierbaren Effekt.

Durch Ko-Kristallisation konnte inzwischen gezeigt werden, dass das Gal4-Peptid in der Spalte von Gal80 gebunden wird (90; 91). Zudem konnte NAD und ein ScGal4-Peptid, welches aber viel kleiner war und nicht die für die Gal80-Bindung kritischen Aminosäuren enthielt, mit ScGal80 ko-kristallisiert werden (Abbildung 17, Abbildung 26.A) (90). Eine Ko-Kristallisation in Gegenwart von NADP war nach Angaben von Kumar *et al.* (2008) nicht möglich. Desweiteren ist durch Pulldown-Experimente gezeigt worden, dass die reduzierten Dinukleotide denselben Einfluss auf die Interaktion von ScGal80 mit der ScGal4-TAD wie die oxidierten Dinukleotide haben (90).

Tabelle 4. Dissoziationskonstanten der Gal80-Dinukleotid-Interaktion in Anwesenheit von AD-22.

Die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D der Gal80-Dinukleotid-Interaktion in Anwesenheit von AD-22 erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben. In Klammern ist die Änderung der K_D -Werte im Vergleich zur NAD(P)-Bindung in Abwesenheit von AD-22 angegeben. Grün bedeutet Zunahme und rot Abnahme der Affinität für die Bindung von NAD(P).

Dinukleotid	K_D -Wert der Dinukleotid-Bindung (mM)	
	ScGal80 und AD-22	KIGal80 und AD-22
NAD	$11,0 \times 10^{-3}$ (0,7)	$15,0 \times 10^{-3}$ (-2,5)
NADP	$9,7 \times 10^{-1}$ (-3,9)	$9,5 \times 10^{-1}$ (-4,5)

ScGal4 (755-881) PLSPGWTDQTAYNAFGITTTGMFNTTTTMDDDVYNYLEDDDEDTPPNPKKE
 KIGal4 (828-865) PTTSGWPDNTNF-LNPS*QQLENTTTTMDDVYNYIFDNDE
 * ** * * ***** **

Abbildung 17. Partielles alignment der C-terminalen Aminosäuren von Gal4 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*.

Partielles Alignment der Transaktivierungs- und Gal80-Interaktionsdomäne von Gal4 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis*. Schwarz unterlegt ist die für die Bindung von ScGal80 kritische Aminosäuresequenz (15). Fett hervorgehoben ist die Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten synthetischen KIGal4-Peptids (AD-22). Die Sequenz des von Kumar *et al.* (2008) verwendeten ScGal4-Peptids (grün) und von Thoden *et al.* (2008) verwendeten KIGal4-Peptids (rot) sind durch Unterstreichung kenntlich gemacht (90; 91). Identische Aminosäuren sind durch Markierung (*) gekennzeichnet. Das alignment wurde mit Hilfe des ExPASy SIM - alignment tool for protein sequences (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>) erstellt.

4.2.4.2 Dinukleotid-Bindung beeinträchtigt die KIGal80-AD-22-Interaktion

Es konnte gezeigt werden, dass AD-22 die NAD(P)-Bindung von KIGal80 beeinträchtigt. Um zu zeigen, dass auch NAD(P) die Bindung von AD-22 an KIGal80 beeinträchtigt, wurden Galaktokinase-Inhibierungsexperimente durchgeführt. Es handelt sich um einen in unserem Labor etablierten gekoppelten enzymatischen Test, bei dem die Galaktokinase-Aktivität von KIGal1 photometrisch detektiert wird (3.4.3) (33). Die Bindung zwischen KIGal1 und KIGal80 führt zur Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von KIGal1. Die Aufhebung der KIGal80 vermittelten Inhibierung von KIGal1 erfolgt durch Zugabe von AD-22. Die Galaktokinase-Inhibierungsexperimente wurden in An- und Abwesenheit von NADP durchgeführt. Somit konnte der Einfluss des Dinukleotids auf die Interaktion von KIGal80 mit KIGal1 und AD-22 untersucht werden.

Im Einschritt-Inhibierungsexperiment zeigte NADP keinen negativen Einfluss auf die KIGal1-Aktivität sowie auf die von KIGal80 vermittelte Inhibierung von KIGal1. Im Messansatz ohne NADP konnte die

von KIGal80-vermittelte Inhibierung von KIGal1 durch AD-22 teilweise aufgehoben werden (Tabelle 5). Dagegen war in Anwesenheit von NADP die Aufhebung der Inhibierung durch AD-22 schwächer. Für NHKIGal80-H99L konnte ebenfalls eine schwächere Aufhebung der Inhibierung durch AD-22 in Anwesenheit von NADP bestimmt werden. Für NHKIGal80-G24V und NHKIGal80-W31G konnte kein Einfluss von NADP auf die Aufhebung der Inhibierung durch AD-22 detektiert werden.

Im Einschritt-Inhibierungsexperiment konnte beobachtet werden, dass die Inhibierung von KIGal1 durch die NHKIGal80-Varianten im Vergleich zum Wildtypprotein etwas schwächer ist (Tabelle 5). Diese schwächere Inhibierung von KIGal1 durch die NHKIGal80-Varianten ist schon zuvor in unserem Labor detektiert worden (63).

Tabelle 5. Einfluss von NADP und AD-22 auf die KIGal80-vermittelte Inhibierung von KIGal1.

Dargestellt ist die KIGal1-Aktivität im Einschritt-Inhibierungsexperiment. Die angegebenen Aktivitäten (%) beziehen sich auf Proben ohne jegliche Zusätze. Die relative Änderung der Aktivität (%) durch NADP bezogen auf die Messung ohne NADP ist in Klammern angegebenen. Für NHKIGal80 wurden vier Messungen, für NHKIGal80-H99L und -W31G zwei Messungen gemittelt. Für NHKIGal80-G24V lag nur eine Messung vor.

KIGal80-Variante	relative Galaktokinase (KIGal1)-Aktivität (%)					
	—		KIGal80		KIGal80 und AD-22	
	- NADP	+ NADP	- NADP	+ NADP	- NADP	+ NADP
NHKIGal80	100,0	95,4 ± 2,7 (4,5 ± 2,7)	46,0 ± 2,4	43,9 ± 1,7 (4,5 ± 3,1)	82,0 ± 7,0	68,2 ± 5,7 (16,8 ± 3,3)
NHKIGal80-H99L	100,0	99,3 ± 0,7 (0,7 ± 0,6)	62,1 ± 0,9	56,5 ± 3,7 (9,0 ± 4,6)	90,7 ± 0,6	82,3 ± 0,3 (9,3 ± 0,3)
NHKIGal80-W31G	100,0	98,7 ± 0,2 (1,3 ± 0,2)	63,2 ± 7,3	61,3 ± 5,4 (2,8 ± 2,7)	76,7 ± 3,0	75,7 ± 3,9 (1,3 ± 1,2)
NHKIGal80-G24V	100,0	97,5 (2,4)	77,5	76,5 (1,3)	94,2	92,0 (2,3)

Im Einschritt-Inhibierungsexperiment war im Messansatz NADH für den gekoppelten Enzymtest enthalten. Um Interferenzen zwischen NAD(H) und NADP im Einschritt-Inhibierungsexperiment auszuschließen wurde ein Zweischnitt-Inhibierungsexperiment durchgeführt (siehe 3.4.3.3). Hierbei konnten die im Einschritt-Inhibierungsexperiment erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Es konnte kein Einfluss von NADP auf die Galaktokinase-Aktivität von KIGal1 detektiert werden (Abbildung 18). Die Inhibierung von KIGal1 durch NHKIGal80 und NHKIGal80-W31G war nicht durch NADP beeinträchtigt. Für NHKIGal80 konnte eine schwächere Aufhebung der Inhibierung von KIGal1 durch AD-22 in Anwesenheit von NADP beobachtet werden. Für NHKIGal80-W31G war erneut kein Einfluss von NADP auf die Aufhebung der Inhibierung von KIGal1 durch AD-22 zu beobachten.

Die in den Galaktokinase-Inhibierungsexperimenten ermittelten Daten, zeigten einen negativen Einfluss von NADP auf die Interaktion von AD-22 und KIGal80. Dagegen hatte NADP keinen Einfluss auf die Interaktion der KIGal80-Varianten, die nicht mehr Dinukleotide binden können, mit AD-22.

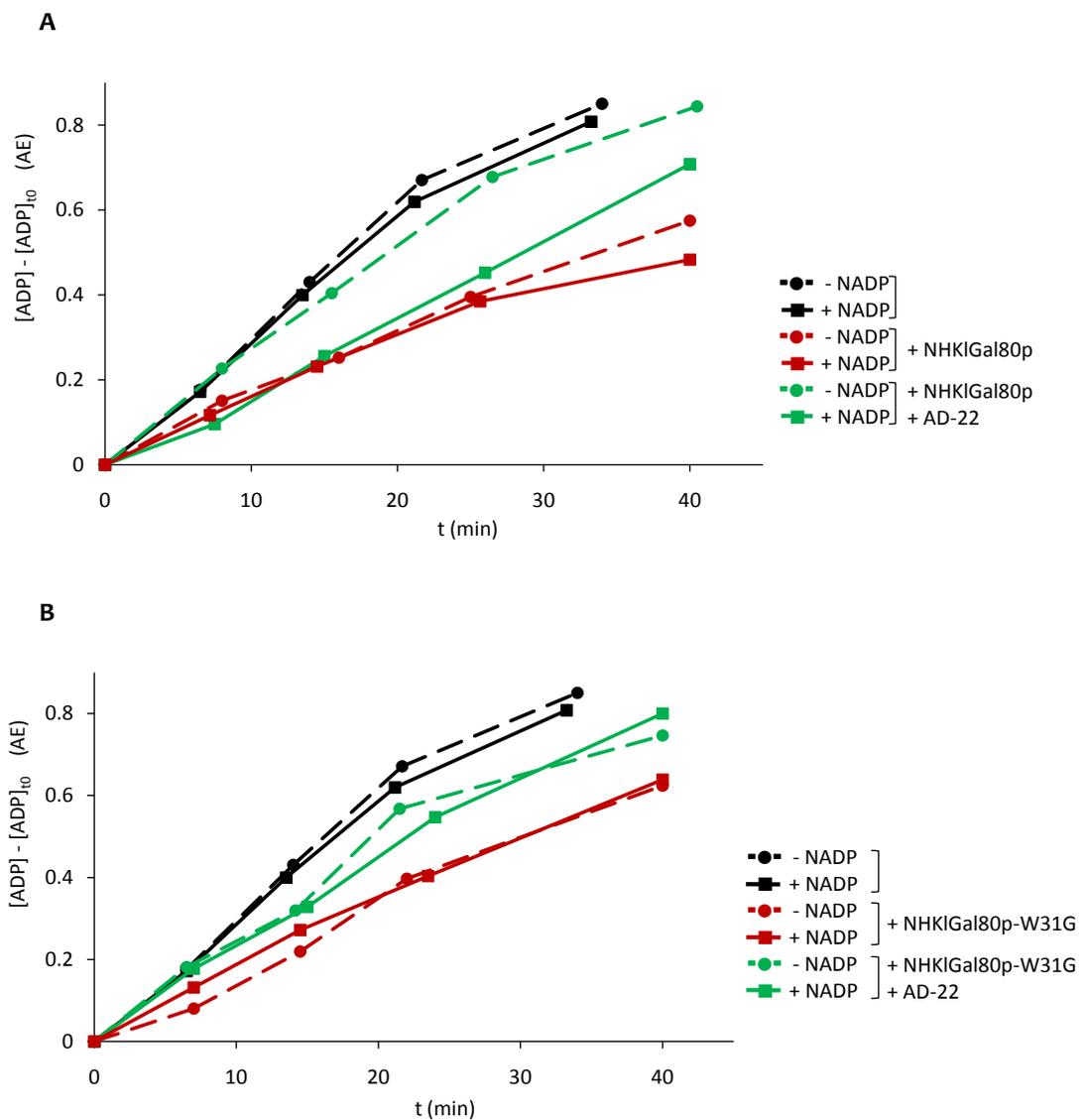


Abbildung 18. Einfluss von NADP auf die Interaktion von KIGal80 mit AD-22.

Dargestellt ist die KIGal1-Aktivität im Zweischritt-Inhibierungsexperiment für (A) NHKIGal80 und (B) NHKIGal80-W31G. Die Reaktionsansätze, welche NHKIGal1 und 380 nM KIGal80 enthielten, wurden jeweils mit und ohne 1 mM NADP bzw. mit und ohne 1,2 μ M AD-22 versetzt. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Galaktose gestartet. Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquots zur Bestimmung von ADP entnommen. Der ADP-Gehalt der zu den Zeitpunkten entnommenen Proben ist in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von ADP (ADP-Gehalt zum Zeitpunkt t_0) dargestellt.

4.3 Untersuchung der Gal80-Dinukleotid-Interaktion *in vivo*

4.3.1 Konstruktion von *K. lactis* KIGAL80-Mutanten-Stämmen

Um zu klären, ob und unter welchen Bedingungen die Dinukleotid-Bindung von Gal80 in *S. cerevisiae* und *K. lactis* eine Rolle als Ligand bei der Regulation des GAL-Transkriptionsschalters spielt, wurde die Expression der LAC- und GAL-Gene untersucht. Die LAC- und GAL-Gene kodieren Proteine und Enzyme, die für die Aufnahme und Verwertung von Laktose bzw. Galaktose für diese Hefen notwendig sind und das Wachstum auf Galaktose bzw. Laktose ermöglichen. Die LAC-Expression (zeigt Gal4-Aktivität an) ist ein oft genutztes Reportersystem um den Einfluss der GAL-regulatorischen Proteine auf die Expression zu untersuchen. In einem Plattentest kann die LAC-Expression visuell sehr sensitiv detektiert werden. Als Indikator wird X-Gal, ein synthetisches Substrat der β -Galaktosidase, kodiert von LAC4, den Nährböden zugesetzt. X-Gal wird wie Laktose über die Laktose-Permease, kodiert von LAC12, in die Zelle aufgenommen und von der β -Galaktosidase gespalten (92). Die Spaltung von X-Gal führt zur Bildung eines blauen Indigofarbstoffs, der die LAC-Expression im Plattentest sichtbar macht.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert wurde, ist die GAL/LAC-Expression in *K. lactis* bei Wachstum auf nicht-reprimierenden Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerin, Ethanol) gering nachweisbar. Bei induzierenden Bedingungen mit Galaktose oder Laktose im Medium werden die GAL/LAC-Gene induziert. Bei Wachstum mit 2% Glukose im Medium ist die GAL/LAC-Expression reprimiert (93). Aus diesem Grund wurde die Glukosekonzentration im Medium verringert, um Bedingungen zu finden, wo die Glukose-Repression aufgehoben ist und LAC-Expression auch in KIGAL80⁺-Stämmen detektiert werden kann. Bei 0,2% Glukose im Medium konnte im *K. lactis*-Stamm JA6 LAC-Expression beobachtet werden (Abbildung 19). Durch die Deletion von KIGAL1 konnte jedoch keine LAC-Expression mehr detektiert werden (Abbildung 19). Aus der Literatur sind keine Daten bekannt, die zuvor auf eine biologische Funktion der KIGal1-KIGal80-Interaktion in Abwesenheit von Galaktose und ATP *in vivo* deuten.

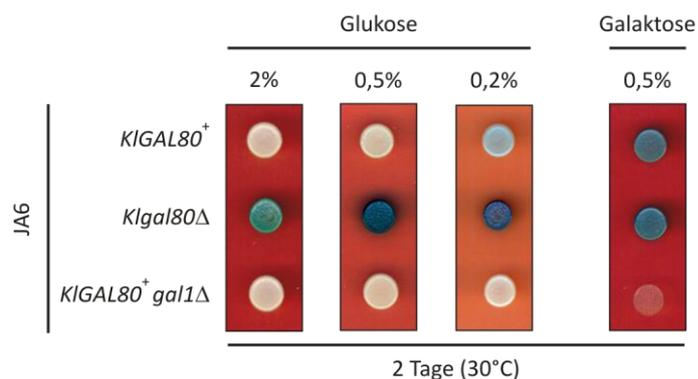


Abbildung 19. KIGAL1-abhängige LAC-Expression bei niedriger Glukosekonzentration in *K. lactis*.

Plattentest von JA6 (*KIGAL80⁺*), JA6/D801R (*Kgal80Δ*) und JA6/D1R (*KIGAL80⁺ gal1Δ*) auf Glukose- und Galaktose-haltigen Nährböden. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug 2%, 0,5% und 0,2%. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die LAC-Aktivität versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

Um einen Einfluss der Aminosäure-Austausche in KIGal80 auf die LAC-Expression zu untersuchen, wurden *K. lactis* *Klgal80*-Mutanten-Stämme konstruiert. Mit Hilfe von integrativen Plasmiden, sollten die *Klgal80*-Allele in den *K. lactis*-Stamm JA6/D801R (*Klgal80* Δ) integriert werden. Die Expression der plasmidkodierten *KIGAL80*-Allele erfolgte vom natürlichen Promotor. Eine Integration im deletierten *KIGAL80*-Locus ist nicht gelungen. Es traten Rekombinationsereignisse auf, wodurch alle Locusintegranten einen *Klgal80* Δ -Genotyp aufwiesen. Eine Integration der plasmidkodierten *KIGAL80*-Allele in andere Loci konnte dagegen nachgewiesen werden. Durch *Southern-Blot*-Analyse wurden Transformanten ermittelt, in denen nur ein *KIGAL80*-Allel integriert worden war (Daten hier nicht gezeigt). Die Integration aller Plasmide erfolgte ausschließlich in unterschiedlichen Loci. Durch die Integration des pIG80-Plasmids (kodiert *KIGAL80*⁺) in den JA6/D801R-Stamm konnte der Wildtypphänotyp von JA6 wiederhergestellt werden (Abbildung 20). Für JA6/D801R pIG80-8 und JA6/D801R pIG80-36, zwei unterschiedliche pIG80-Integranten, konnte kein Einfluss des Integrationsortes auf die Repression festgestellt werden (Abbildung 20). Dagegen wurden für die Stämme JA6/D801R pIG80-G24V-5, -31 und -32, drei unterschiedliche pIG80-G24V-Integranten, die das *Klgal80*-G24V-Allel trugen, unterschiedlich stark reprimierte Phänotypen auf 2% Glukose-haltigen Nährböden detektiert (Abbildung 20). Für die *K. lactis*-Mutanten, die das Allel *Klgal80*-W31G oder *Klgal80*-H99L trugen, wurden im Vergleich zur Mutante *Klgal80*-G24V ähnlich variable Phänotypen bei 2% Glukose detektiert (Daten hier nicht gezeigt). Die beobachtete Induktion war für alle pIG80-Integranten und pIG80-Mutanten-Integranten gleich.

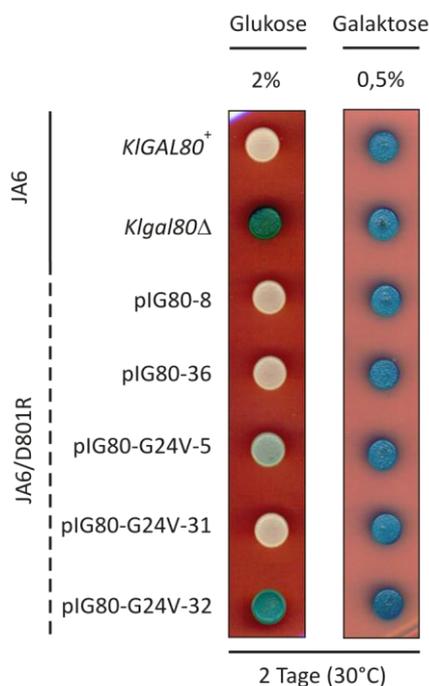


Abbildung 20. **Vom Integrationsort abhängiger Phänotyp der *Klgal80*-G24V-Mutante in *K. lactis*.**

Plattentest von JA6 (*KIGAL80*⁺), JA6/D801R (*Klgal80* Δ), JA6/D1R (*KIGAL80*⁺ *gal1* Δ) und der JA6/D801R pIG80- (*KIGAL80*⁺) bzw. pIG80-G24V (*Klgal80*-G24V)-Stämme auf 2% Glukose- und 0,5% Galaktose-haltigen Nährböden. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die LAC-Aktivität versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

Die bei reprimierenden und induzierenden Bedingungen beobachteten Phänotypen der *Klgal80*-Mutanten in Abhängigkeit vom Integrationsort der *Klgal80*-Allele könnten auf unterschiedliche Expressionsmengen der *KIGAL80*-Varianten zurückzuführen sein (nicht bestimmt). Unterschiedliche *KIGAL80*-Konzentrationen könnten den Einfluss der Mutationen in *KIGAL80* auf die *KIGAL4*-*KIGAL80*- und *KIGAL1*-*KIGAL80*-Interaktion überlagern. Eine höhere *KIGAL80*-Konzentration könnte zu einer stärkeren

Inhibierung von KGal4 und langsameren Induktion führen. Eine niedrigere KGal80-Konzentration könnte zu einer schwächeren Inhibierung führen, wodurch die KGal4-TAD freigesetzt ist und KGal4 die Transkription aktivieren kann. Deshalb ist es erforderlich, dass die KGal80-Varianten vom gleichen Locus exprimiert werden, damit diese in gleicher Konzentration wie das Wildtypprotein vorliegen. Da die Integration des Plasmids im deletierten *KGAL80*-Locus nicht möglich war, sollten die *K. lactis* Mutanten-Stämme durch *gene replacement* konstruiert werden. Das *gene replacement* ist in *S. cerevisiae* eine sehr einfache Methode zur Substitution von einem Gen oder eines Genabschnitts im Chromosom durch eine entsprechende, *in vitro* synthetisierte, andersartige Gensequenz. In *K. lactis* ist diese Methode jedoch sehr ineffektiv (94). Es wurden verschiedene Transformationsbedingungen getestet (Veränderung der DNA-Menge, Variierung von Temperatur und Inkubationszeiten) und mehrere hundert Transformanten analysiert. Es wurden aber keine positiven Transformanten erhalten. Eine Konstruktion der *K. lactis* Mutanten-Stämme durch *gene replacement* im deletierten *KGAL80*-Locus ist nicht gelungen.

4.3.2 LAC-Expression in *S. cerevisiae* ist vom *ScGAL80*-Allel abhängig

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Konstruktion von *K. lactis* *Kgal80*-Mutanten-Stämmen durch Plasmidintegration und *gene replacement* im deletierten *KGAL80*-Locus nicht möglich war. Daher wurden *S. cerevisiae* *Scgal80*-Mutanten-Stämme durch *gene replacement* konstruiert. Zur Konstruktion der *Scgal80*-Mutanten-Stämme wurde der *S. cerevisiae* FI4-Stamm, in dem die *LAC*-Gene aus *K. lactis* integriert worden waren, verwendet (66). Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass eine *LAC*-Expression und Wachstum bei induzierenden Bedingungen (Galaktose und Laktose) für den FI4-Stamm nicht beobachtet werden konnte. Es wurden 60 unabhängig voneinander entstandene spontane Mutanten, die auf Laktose wachsen konnten, isoliert und klassifiziert. Die Klasse I Mutanten tragen eine Mutation in *SIN4* und die Klasse II Mutanten sind in *GAL80* mutiert (Langhammer, R.). *SIN4* ist ein negativer Regulator der basalen Transkription einer Reihe von Genen in *S. cerevisiae* (95). Der reprimierende Einfluss von *SIN4* auf die Transkription der *LAC*-Gene liegt dabei vorrangig auf *LAC4* (96). Der Wirkmechanismus von *SIN4* auf *LAC4* konnte bisher noch nicht geklärt werden. Durch die gezielte Deletion von *SIN4* in den konstruierten FI4 *Scgal80*-Mutanten-Stämmen entstanden die FI4 *sin4* Δ *Scgal80*-Mutanten-Stämme, die zur Analyse verwendet wurden. Desweiteren wurde ein FI4 *sin4* Δ *gal80* Δ -Stamm konstruiert, der als Kontrollstamm diente.

Wie in *K. lactis* ist auch in *S. cerevisiae* die Transkription der *GAL*-Gene aufgrund der Glukose-Repression unter reprimierenden Bedingungen (2% Glukose) nicht nachweisbar (97). Unter Bedingungen, in denen die Glukose-Repression aufgehoben ist, kann die Expression der *LAC*-Gene im *Scgal80* Δ -Stamm detektiert werden, da *ScGal4* konstitutiv die Transkription der *LAC*-Gene aktivieren kann (Abbildung 21). Für den Stamm FI4 *sin4* Δ *ScGAL80*⁺, der das Wildtypallel von *ScGAL80* trägt, konnte wie für den *K. lactis*-Stamm JA6 eine deutliche Blaufärbung bei 0,2% Glukose im Medium beobachtet werden (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 21). Die *LAC*-Expression war dagegen im Stamm FI4 *sin4* Δ *Scgal80-H99L* (*Scgal80-H99L*-Mutante) schwächer und im Stamm FI4 *sin4* Δ *Scgal80-G24V* (*Scgal80-G24V*-Mutante) nicht detektierbar. Die für *ScGAL80*⁺ und die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* beobachteten Phänotypen korrelierten hierbei mit den Affinitäten

der ScGal80-Varianten für den Liganden (Tabelle 3). Diese Daten deuten auf eine festere Bindung von ScGal80-H99L und ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 an ScGal4 hin.

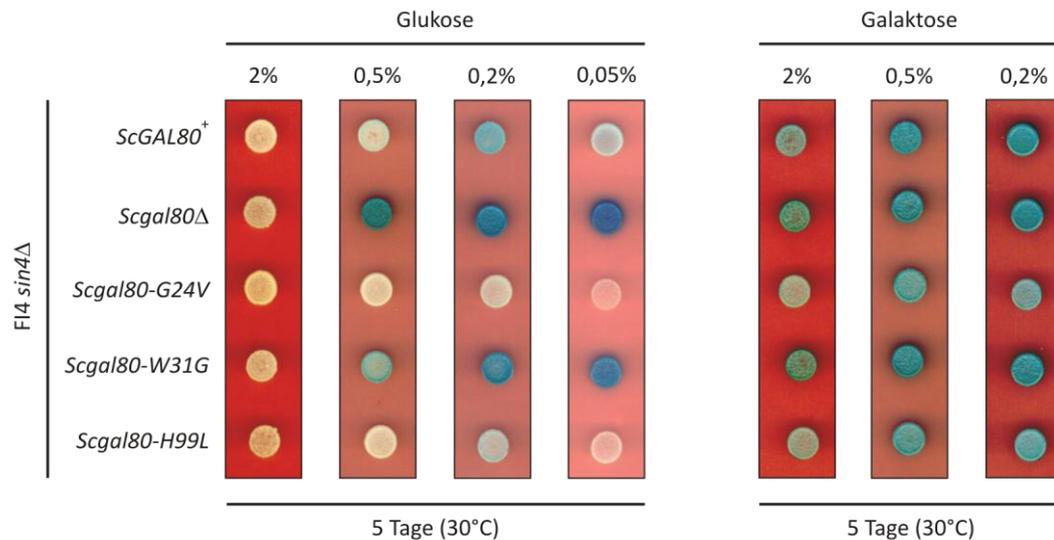


Abbildung 21. **ScGAL80-abhängige LAC-Expression bei niedrigen Glukosekonzentrationen in *S. cerevisiae*.**

Plattentest der FI4 *sin4Δ* ScGAL80-Stämme auf Glukose- und Galaktose-haltigen Nährböden: ScGAL80⁺, Scgal80-G24V, Scgal80-W31G und Scgal80-H99L. Der FI4 *sin4Δ gal80Δ*-Stamm diente als Kontrolle. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle (%) wurde wie angegebenen variiert. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die LAC-Aktivität versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

Im Gegensatz zur Mutante Scgal80-G24V wurde für die Mutante Scgal80-W31G eine starke LAC-Expression beobachtet (Abbildung 21). Die LAC-Expression der Mutante Scgal80-W31G kann dadurch erklärt werden, dass die eingeführte Mutation nicht nur die Dinukleotid-Bindung sondern gleichzeitig die ScGal4-ScGal80-Interaktion beeinträchtigt. Dass das Tryptophan 31 sowohl an der Dinukleotid-Bindung als auch an der Bindung der ScGal4-TAD beteiligt sein kann, zeigt die Ko-Kristallstruktur von ScGal80 mit NAD und einem ScGal4-Peptid (Abbildung 26.A).

Für ScGAL80⁺ konnte mit 0,05% Glukose im Medium noch eine schwache LAC-Expression bei einem guten Wachstum beobachtet werden (Abbildung 21). Für die Mutante Scgal80-H99L und besonders für die Mutante Scgal80-G24V ist das Wachstum mit 0,05% Glukose im Vergleich zu 0,2% Glukose im Medium stark reduziert. Dagegen zeigte die Mutante Scgal80-W31G unter diesen Bedingungen ein zum Scgal80Δ-Stamm vergleichbares Wachstum und ähnlich hohe LAC-Expression. Demnach scheint bei sehr niedrigen Glukosekonzentrationen nicht nur die LAC-Expression sondern auch das Wachstum der Mutanten Scgal80-H99L und Scgal80-G24V beeinträchtigt zu sein. Die schwächere LAC-Expression der Mutanten Scgal80-H99L und Scgal80-G24V im Vergleich zu ScGAL80⁺ deutet auf eine stärkere Inhibierung von ScGal4 durch ScGal80-H99L und ScGal80-G24V hin. Dies sollte auch für die Expression der GAL-Gene zu zutreffen. Die Galaktose-Permease Gal2p ist als hoch affiner Glukosetransporter charakterisiert worden, der bei 0,05%-0,1% Glukose aktiv ist und eine erhöhte Expression bei niedrigen Glukosekonzentrationen ähnlich HXT17, einem weiteren hoch affinen

Glukosetransporter in *S. cerevisiae*, zeigt (98). Eine schwächere *GAL2*-Expression in den Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* bei 0,05% Glukose könnte zu einer verminderten Glukoseaufnahme führen, die wiederum zu einem reduzierten Wachstum dieser Mutanten führen könnte.

Unter induzierenden Bedingungen (Galaktose) konnte für alle *ScGAL80*-Stämme Wachstum und *LAC*-Expression beobachtet werden (Abbildung 21). Für die Mutante *Scgal80-W31G* konnte erneut einen zum *Scgal80Δ*-Stamm ähnlichen Phänotypen detektiert werden. Für die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* wurde im Vergleich zu *ScGAL80⁺* eine schwächere *LAC*-Expression beobachtet. Diese Daten könnten auf eine verminderte Affinität für ScGal3 oder auf eine höhere Affinität für ScGal4 dieser ScGal80-Varianten hindeuten.

4.3.3 *LAC*-Expression bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist *ScGAL3*-abhängig

Für *K. lactis* konnte gezeigt werden, dass die bei 0,2% Glukose beobachtete *LAC*-Expression von *KIGAL1* abhängig ist (Abbildung 19). Um zu testen, ob die in *S. cerevisiae* bei 0,2% Glukose beobachtete *LAC*-Expression von *ScGAL3* abhängig ist, wurde *ScGAL3* in den *FI4 sin4Δ ScGAL80*-Stämmen deletiert. Eine physikalische Interaktion von ScGal3 und ScGal80 ohne ATP und Galaktose sowie eine konstitutive Expression der *GAL*-Gene unter nicht induzierenden Bedingungen durch Überexpression von ScGal3 wurde bereits gezeigt (38; 39; 99). Hinweise, die auf eine biologische Funktion der ScGal3-ScGal80-Interaktion, außer der ATP und Galaktose abhängigen Interaktion unter induzierenden Bedingungen, deuten würden, sind aus der Literatur nicht bekannt.

Durch Einführung einer *ScGAL3*-Deletion konnte eine *ScGAL3*-Abhängigkeit der beobachteten *LAC*-Expression für *ScGAL80⁺* und der Mutante *Scgal80-H99L* bei 0,2% Glukose im Medium gezeigt werden (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Demnach könnten die in Abbildung 21 bei 0,2% Glukose gezeigten Phänotypen von *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* auf eine geringere Affinität dieser ScGal80-Varianten für ScGal3 zurückzuführen sein. Für *Scgal80-W31G* konnte wie für *Scgal80-G24V* keine *LAC*-Expression im *Scgal3Δ*-Hintergrund bei 0,2% Glukose detektiert werden (Abbildung 22). Im *Scgal3Δ*-Hintergrund konnten demnach gleiche Phänotypen für die Mutanten *Scgal80-W31G* und *Scgal80-G24V* beobachtet werden, was aber nicht im *ScGAL3⁺*-Hintergrund zuvor beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Diese Daten deuten daraufhin, dass die Variante ScGal80-W31G im Vergleich zur Variante ScGal80-G24V schwächer mit ScGal4 interagiert aber nicht prinzipiell in der Interaktion mit ScGal4 gestört ist. Zusammengefasst konnte im *Scgal3Δ*-Hintergrund bei 0,2% Glukose kein Unterschied in den Phänotypen für die *ScGAL80*-Allele detektiert werden (Abbildung 22). Alle ScGal80-Varianten inhibierten ScGal4 im *Scgal3Δ*-Hintergrund bei 0,2% Glukose wie ScGal80.

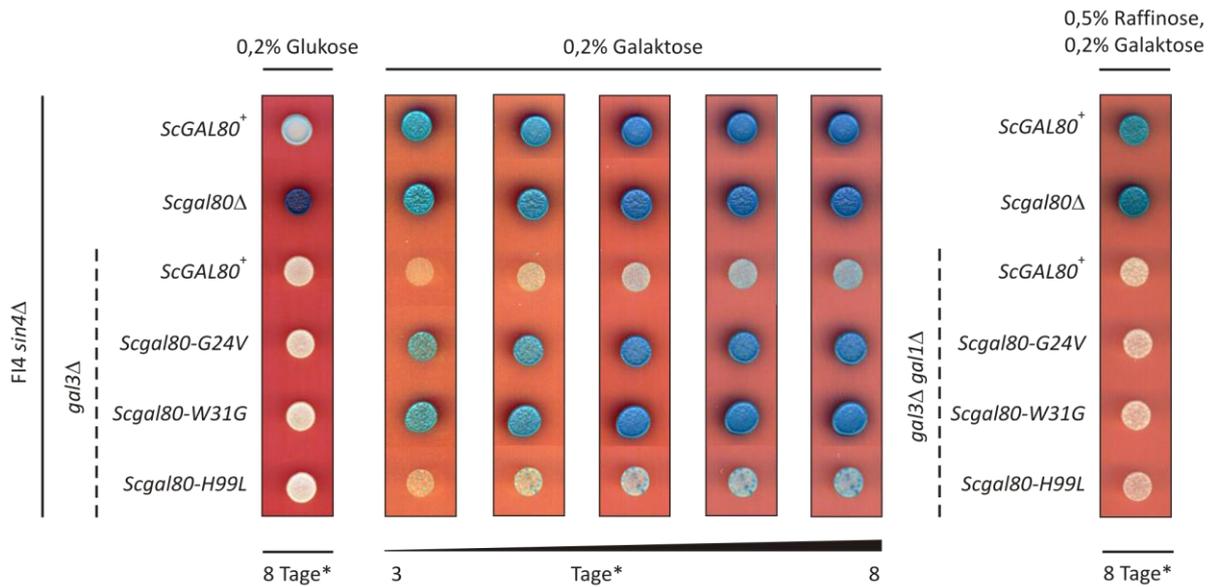


Abbildung 22. **GAL3-Abhängigkeit der LAC-Expression bei 0,2% Glukose in *S. cerevisiae*.**

Plattentest der *FI4 sin4Δ gal3Δ ScGAL80-* und *FI4 sin4Δ gal3Δ gal1Δ ScGAL80-* Stämme auf Glukose-, Galaktose- und Raffinose-haltigen Nährböden: *ScGAL80+*, *Scgal80-G24V*, *Scgal80-W31G* und *Scgal80-H99L*. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug 2%, 0,5% und 0,2%. Der *FI4 sin4Δ gal80Δ*-Stamm diente als Kontrolle. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die *LAC*-Aktivität versetzt. (*) Die Inkubation erfolgte zunächst für 3 Tage bei 30°C und für weitere 5 Tage bei RT. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

Im *Scgal3Δ*-Hintergrund ist die Induktion der *GAL*-Gene um mehrere Tage verzögert (*long-term-adaption*-Phänotyp), hierbei übernimmt *ScGal1* die Funktion von *ScGal3* als Regulator von *ScGal80* (34; 100; 101). Ein Grund für die verzögerte Induktion ist wahrscheinlich die niedrigere basale Expression von *ScGAL1* und eine schwächere Interaktion von *ScGal1* mit *ScGal80* (40; 41; 99). Durch die Deletion von *ScGAL3* konnte für *ScGAL80+* erst nach fünftägiger Inkubation ein schwaches Wachstum und schwache *LAC*-Expression auf Galaktose-haltigem Medium beobachtet werden (Abbildung 22). Dagegen war für *Scgal80-G24V* und *Scgal80-W31G* im *Scgal3Δ*-Hintergrund ein deutliches Wachstum und starke *LAC*-Expression bereits nach drei Tagen Inkubation auf Galaktose-haltigem Medium zu beobachten. Desweiteren konnte auch für *Scgal80-H99L* ein zu *ScGAL80+* leicht verbessertes Wachstum und erhöhte *LAC*-Expression detektiert werden. Auffällig sind außerdem die für *Scgal80-H99L* auftretenden blauen Minikolonien, die bei *ScGAL80+* schwächer ausgeprägt sind. Von Zelle zu Zelle kann die Konzentration der *GAL*-regulatorischen Proteine schwanken, so dass einige Zellen zum Beispiel durch eine niedrigere *ScGal80*-Konzentration von vornherein in der Induktion begünstigt sind (102). Dieser Effekt scheint durch das *Scgal80-H99L*-Allel verstärkt zu sein. Dass die im *Scgal3Δ*-Hintergrund beobachteten Phänotypen tatsächlich von *ScGAL1* abhängig sind, konnte durch die zusätzliche Deletion von *ScGAL1* gezeigt werden (Abbildung 22).

ScGal3 und *ScGal1* weisen in der Aminosäuresequenz ~74% Sequenzidentität und ~92% Ähnlichkeit auf. Wenn die von den Allelen *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* kodierten *ScGal80*-Varianten in der Interaktion mit *ScGal3* beeinträchtigt wären, was zunächst die in Abbildung 21 gezeigten Daten andeuten, könnte dies auch für die Interaktion mit *ScGal1* zutreffen. Demnach wäre für diese *Scgal80*-Mutanten ein stärker ausgeprägter *long-term-adaption*-Phänotyp im Vergleich zu *ScGAL80+*

zu erwarten gewesen. Das konnte aber nicht beobachtet werden (Abbildung 22). Im Gegenteil, für *Scgal80-H99L* und besonders für *Scgal80-W31G* und *Scgal80-G24V* wurde ein besseres Wachstum und stärkere *LAC*-Expression im *Scgal3Δ*-Hintergrund beobachtet, was auf eine höher affine Interaktion der ScGal80-Varianten mit ScGal1 hindeutet. Hierbei konnte erneut eine Korrelation der beobachteten Phänotypen mit der Affinität von ScGal80 und der ScGal80-Varianten für den Liganden festgestellt werden (Tabelle 3).

4.3.4 Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* induzierten langsamer als *ScGAL80⁺*

Unter induzierenden Bedingungen weisen die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* eine etwas schwächere *LAC*-Expression im Vergleich zu *ScGAL80⁺* auf, was auf eine schwächere Induktion der *Scgal80*-Mutanten hinweist (Abbildung 21, Abbildung 23.C). Andererseits induzierten diese Stämme im *Scgal3Δ*-Hintergrund besser als *ScGAL80⁺* (Abbildung 22). Durch Aufnahme einer Kinetik sollte die Induktion der Mutanten *Scgal80-H99L*, *Scgal80-W31G* und *Scgal80-G24V* im *ScGAL3⁺*-Hintergrund genauer untersucht werden. Hierzu wurden die Hefen in 0,5% Glukose-haltigem Flüssigmedium vorgezogen und anschließend in 0,5% Galaktose-haltiges Flüssigmedium umgesetzt. Es wurde eine 0,5%ige Glukosekonzentration gewählt, damit möglichst weder reprimierende noch aktivierende Bedingungen vorherrschten (siehe hierzu Abbildung 21). Die Bestimmung der *LAC*-Expression erfolgte durch Messung der *LAC4*-Aktivität in einem enzymatischen Test (3.4.4).

Für die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* war kein Einfluss der *Scgal80*-Allele auf die Ausgangsaktivität von *LAC4* bei 0,5% Glukose gegenüber *ScGAL80⁺* feststellbar (Abbildung 23.A). Diese Beobachtung stimmt mit den im Plattentest beobachteten Phänotypen für *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* überein (Abbildung 21). Diese Daten und die Phänotypen im Plattentest deuten daraufhin, dass die Varianten ScGal80-H99L und ScGal80-G24V nicht in der Interaktion mit ScGal4 beeinträchtigt sind.

Für die Mutante *Scgal80-W31G* wurde bei 0,5% Glukose eine deutlich erhöhte *LAC4*-Aktivität, was mit den in den Plattentest beobachteten Phänotypen konsistent ist, detektiert (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 23.A). Die Mutante *Scgal80-W31G* induzierte zudem schneller als *ScGAL80⁺* und zeigte ein schnelleres Wachstum (Abbildung 23.A, Anhang A3). Die Mutante *Scgal80-G24V* induzierte anfänglich etwas schneller, erreichte aber nur 70-80% der *LAC4*-Aktivität von *ScGAL80⁺* (Abbildung 23.A und B). Vierundzwanzig Stunden nach der Induktion nahm die *LAC4*-Aktivität in *ScGAL80⁺* wieder ab (Abbildung 23.B). Nach 72 Stunden wies *ScGAL80⁺* die anfängliche *LAC4*-Aktivität wieder auf, dagegen zeigte die Mutante *Scgal80-G24V* immer noch deutliche *LAC4*-Aktivität. Dies könnte auf einen langsameren Verbrauch der Galaktose im Flüssigmedium durch in der Mutante *Scgal80-G24V* zurückzuführen sein. Für die Mutante *Scgal80-G24V* wurde gegenüber *ScGAL80⁺* ein etwas langsames Wachstum in Galaktose beobachtet (Anhang A3). Demnach werden wahrscheinlich auch die *GAL*-Gene in der Mutante *Scgal80-G24V* langsamer induziert. Die Optische Dichte nach dem Erreichen der stationären Phase war für *ScGAL80⁺* und *Scgal80-G24V* gleich (Anhang A3). Die Mutante *Scgal80-H99L* induzierte langsamer als *ScGAL80⁺* und erreichte nach 7 Stunden ca. 50% der *LAC4*-Aktivität von *ScGAL80⁺* (Abbildung 23.A).

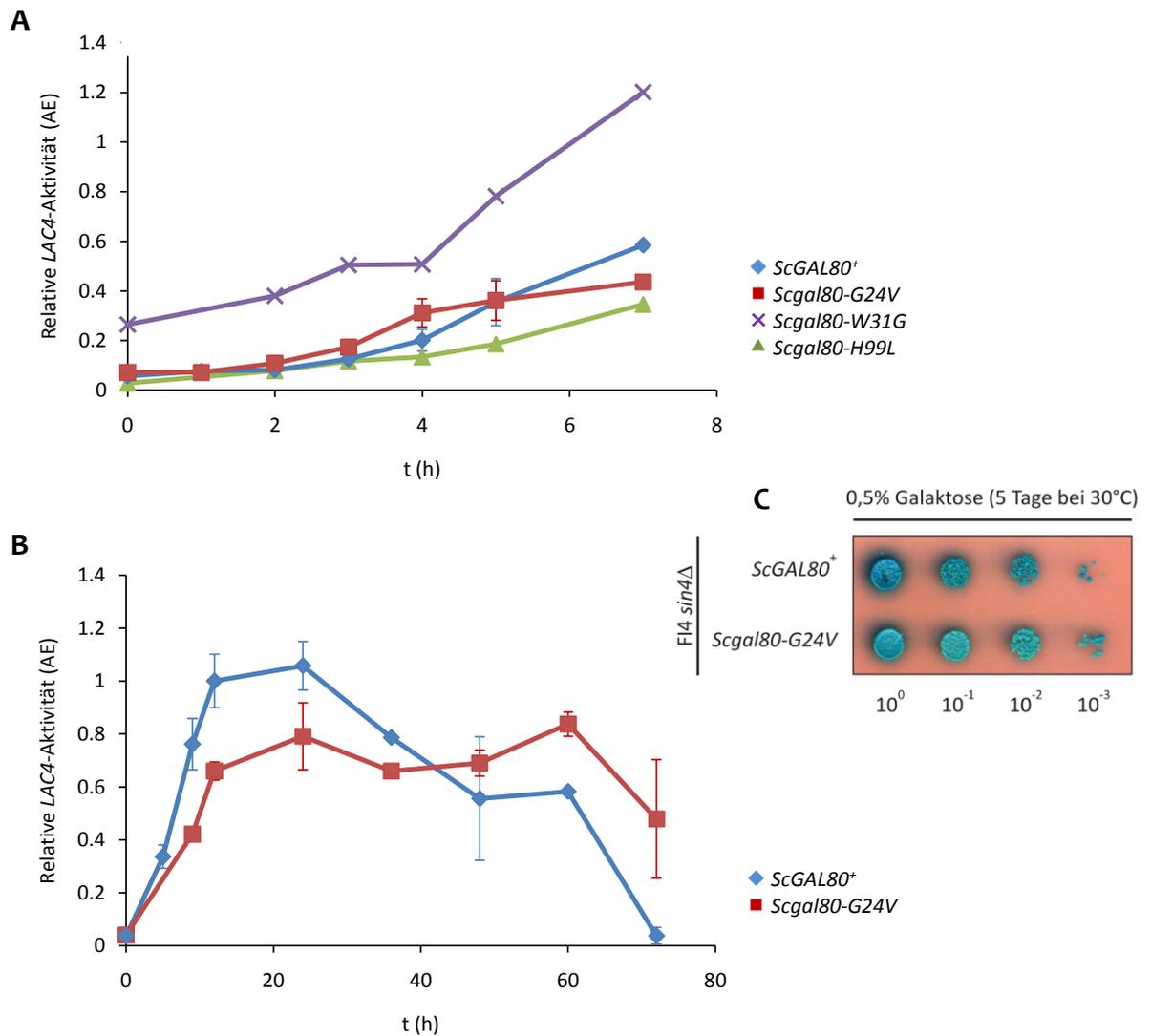


Abbildung 23. Einfluss der *ScGAL80*-Allele auf die Kinetik der *LAC4*-Induktion in *S. cerevisiae*.

(A) Dargestellt ist die zeitabhängige Zunahme der relativen *LAC4*-Aktivität der *Fl4 sin4Δ ScGAL80*-Stämme, bezogen auf den *Fl4 sin4Δ ScGAL80*⁺-Stamm, nach Induktion mit Galaktose: *ScGAL80*⁺ (◆), *Scgal80-G24V* (■), *Scgal80-W31G* (×) und *Scgal80-H99L* (▲). Die Hefekulturen wurde in 0.5% Glukose-haltigem Medium angezogen (t = 0 h) und zur Induktion der *LAC4*-Expression in 0.5% Galaktose-haltiges Medium umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in mit allen Aminosäuren supplementiertem Minimalmedium als Schüttelkultur bei 30°C. Für *ScGAL80*⁺ und *Scgal80-G24V* wurden 3 Messungen gemittelt, wobei eine Messung im Set mit *Scgal80-W31G* und *Scgal80-H99L* erfolgte. Zur Induktion wurde eine OD₆₀₀ von 0,9 eingestellt. (B) Zur Bestimmung der *LAC4*-Aktivität bis zu 72 Stunden nach der Induktion wurden 3 Messungen mit *ScGAL80*⁺ und *Scgal80-G24V* durchgeführt. Zur Induktion wurde eine OD₆₀₀ von 0,6 eingestellt. (C) Plattentest einer seriellen Zellverdünnung von *ScGAL80*⁺ und *Scgal80-G24V* auf 0,5% Galaktose-haltigem Nährboden, der mit allen Aminosäuren supplementiert wurde. Als Indikator für die *LAC*-Aktivität wurde X-Gal dem Nährboden zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

Durch die Kinetik konnten die zuvor im Plattentest beobachteten Phänotypen der *ScGAL80*-Stämme bei induzierenden Bedingungen (Galaktose) bestätigt werden (Abbildung 21). Die langsamere Induktion von *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* könnte auf eine schwächere Interaktion der *ScGal80*-Varianten im Vergleich zu *ScGal80* mit *ScGal3* hindeuten. Andererseits könnte auch in den Mutanten

Scgal80-H99L und *Scgal80-G24V* im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ die Galaktokinase-Aktivität von ScGal1 niedriger sein. Die in der Abbildung 22 im *Scgal3Δ*-Hintergrund gezeigten Phänotypen von *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* deuten auf eine stärkere Interaktion von ScGal80-H99L und ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 mit ScGal1 hin. Die Inhibierung der Galaktokinase-Funktion von ScGal1 würde zu einem langsameren Verbrauch der Galaktose im Medium und zu einem langsameren Wachstum der Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* führen.

4.3.5 *Scgal80-H99L*- und *Scgal80-G24V*-Mutante zeigten keine Induktion mit Laktose

Die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* zeigten im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ eine etwas schwächere *LAC*-Expression auf Galaktose-haltigem Medium. Das Wachstum dieser Mutanten war aber nicht offensichtlich beeinträchtigt (Abbildung 24). Dagegen konnte im *Scgal3Δ*-Hintergrund auf Galaktose-haltigem Medium eine stärkere *LAC*-Expression und besseres Wachstum von *Scgal80-H99L* und insbesondere von *Scgal80-G24V* im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ beobachtet werden (Abbildung 22). Erstaunlich ist aber, dass *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* im *ScGAL3*⁺ und *Scgal3Δ*-Hintergrund auf Nährböden mit Laktose als Kohlenstoffquelle nicht induzieren und wachsen¹ konnten (Abbildung 24). Es traten bei 0,2% Laktose im Medium lediglich ein paar Minikolonien auf (Abbildung 24.A).

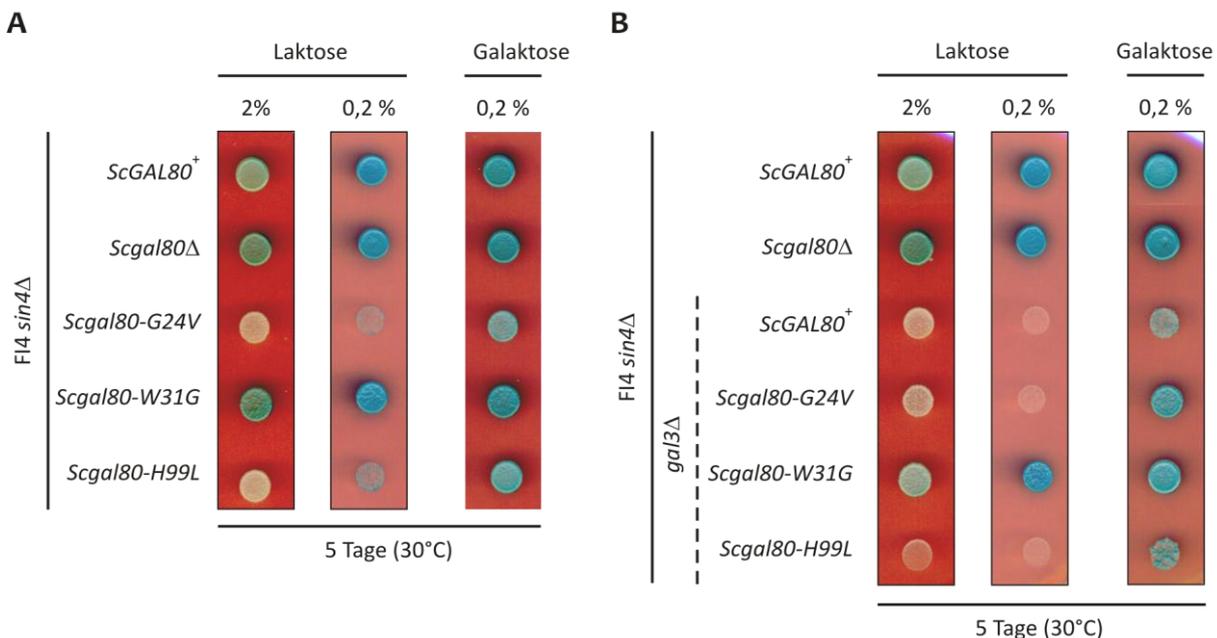


Abbildung 24. **Laktoseverwertung in *S. cerevisiae* ist vom *ScGAL80*-Allel abhängig.**

Plattentest der **A.** *FI4 sin4Δ ScGAL80*- und **B.** *FI4 sin4Δ gal3Δ ScGAL80*-Stämme auf Laktose- und Galaktose-haltigen Nährböden: *ScGAL80*⁺, *Scgal80-G24V*, *Scgal80-W31G* und *Scgal80-H99L*. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug 2% und 0,2%. Der *FI4 sin4Δ gal80Δ*-Stamm diente als Kontrolle. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die *LAC*-Aktivität versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

¹ Durch Hydrolyse ist Laktose zu einem geringen Anteil mit Glukose verunreinigt. Bei hohen Laktosekonzentrationen wird daher oft ein schwaches Wachstum von *Lac*⁻ Stämmen beobachtet.

Die Galaktose-abhängige Induktion erfolgt durch ScGal3 bzw. bei der Deletion von *ScGAL3* durch ScGal1. Bei Laktose als Kohlenstoffquelle muss diese erst in die Zelle aufgenommen und in Galaktose und Glukose gespalten werden, damit ScGal3 bzw. ScGal1 aktiv werden können. Die Aufnahme und Spaltung von Laktose erfordert die basale Transkription von *LAC12* und *LAC4*. Die basale Transkription der *GAL*-Gene ist von Gal4 abhängig und beruht auf einer nicht vollständigen Repression durch ScGal80 (4). Da die Laktose-Induktion durch die *ScGAL80*-Allele beeinflusst wird, gilt dies in *S. cerevisiae* vermutlich auch für die *LAC*-Gene. Die Tatsache, dass eine Induktion durch Laktose in den Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* nicht ausreicht, deutet auf eine niedrigere basale Expression im Vergleich zum Wildtypallel *ScGAL80*⁺. Eine niedrigere basale Expression deutet auf eine festere Bindung an ScGal4 von ScGal80-H99L und ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 hin. Eine festere Bindung an ScGal4 dieser ScGal80-Varianten gegenüber ScGal80 könnte auf die fehlende Bindung des Liganden zurückzuführen sein.

4.3.6 Gal80-G24V aus *K. lactis* ersetzt nicht ScGal80-G24V in *S. cerevisiae*

Im Abschnitt 4.3.1 wurde beschrieben, dass die Konstruktion von *K. lactis* Mutanten-Stämmen durch die Integration eines integrativen Plasmids oder *gene replacement* im deletierten *KIGAL80*-Locus nicht gelungen ist. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Mutationen in *KIGAL80* auf die Repression und Induktion haben, wurden mittels *gene replacement* das *KIGAL80*⁺-Allel bzw. das *KIGAL80*⁺-G24V-Allel hinter den *ScGAL80*-Promotor in den *S. cerevisiae*-Stamm F14 *sin4Δ gal80Δ* inseriert. Es entstanden die Stämme F14 *sin4Δ P_{ScGAL80}-KIGAL80*⁺ und F14 *sin4Δ P_{ScGAL80}-Kgal80-G24V*. Für KIGal80 konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NAD und NADP durch AD-22 beeinträchtigt ist, was auf eine Überlappung der Bindungsstellen für die KIGal4- und Dinukleotid-Bindung in KIGal80 hindeutet (Tabelle 4). Daher sollte untersucht werden, ob die in der Dinukleotid-Bindung gestörte Variante KIGal80-G24V in der Interaktion mit ScGal4 *in vivo* beeinträchtigt ist.

Für *KIGAL80*⁺ konnte *LAC*-Expression bei niedriger Glukosekonzentration beobachtet werden, die aber schwächer im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ war (Abbildung 25). Diese Daten deuten auf eine festere Bindung an ScGal4 von KIGal80 im Vergleich zu ScGal80 hin. Für die beobachteten Phänotypen von *KIGAL80*⁺ und *ScGAL80*⁺ konnte eine Korrelation der Affinitäten von KIGal80 und ScGal80 für den Liganden festgestellt werden (Tabelle 2). Für die Mutante *Kgal80-G24V* konnte im Gegensatz zur Mutante *Scgal80-G24V* eine starke *LAC*-Expression beobachtet werden, die einen negativen Einfluss der Mutation auf die ScGal4-KIGal80-Interaktion zeigt (Abbildung 25). Demzufolge binden die Varianten ScGal80-G24V und KIGal80-G24V vermutlich unterschiedlich an ScGal4.

Die für die *LAC*-Gene beobachtete Induktion sowie das Wachstum auf Galaktose-haltigem Medium von *KIGAL80*⁺ und *ScGAL80*⁺ war gleich (Abbildung 25). Demnach ist die Interaktion von KIGal80 und ScGal80 mit ScGal3 in *S. cerevisiae* vergleichbar. In *K. lactis* ist eine Induktion mit ScGal3 anstelle von KIGal1 nicht möglich (27). Eine Induktion mit ScGal3 ist erst nach Austausch von KIGal80 gegen ScGal80 in *K. lactis* beobachtet worden (27). Zenke *et al.* (1999) zeigten, dass KIGal80 im Vergleich zu ScGal80 reguliert phosphoryliert wird (42). Bei nicht-induzierenden Bedingungen (Glycerin, Glukose) liegt KIGal80 in phosphorylierter Form vor und wird bei induzierenden Bedingungen (Galaktose) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von KIGal80 ist von der regulatorischen Funktion von KIGal1 abhängig (42). Durch Serin-Aspartat-Austausche (S352D, S354D) gibt es deutliche Hinweise,

dass die Phosphorylierung von KIGal80 die Induktion verzögert und das induzierte Niveau verringert (Kapp, L. und Breunig, K. D., nicht-publizierte Daten). Es ist vorstellbar, dass die Phosphorylierung von KIGal80 die Interaktion mit KIGal1 beeinträchtigt. Dies könnte auch für die Interaktion von KIGal80 und ScGal3 zu treffen. Ob eine Dephosphorylierung von KIGal80 durch die regulatorische Funktion von ScGal3 in *K. lactis* erfolgt, ist noch nicht untersucht worden. In *S. cerevisiae* konnte das phosphorylierte Peptid von KIGal80 nachgewiesen werden. Es gibt aber keine quantitativen Daten, die zeigen wie stark die Phosphorylierung von KIGal80 in *S. cerevisiae* ist (Breunig, K. D., persönliche Mitteilung). Es wäre vorstellbar, dass KIGal80 in *S. cerevisiae* nur schwach phosphoryliert wird, wodurch die Interaktion mit ScGal3 nicht gestört wird und dies zur Induktion führt.

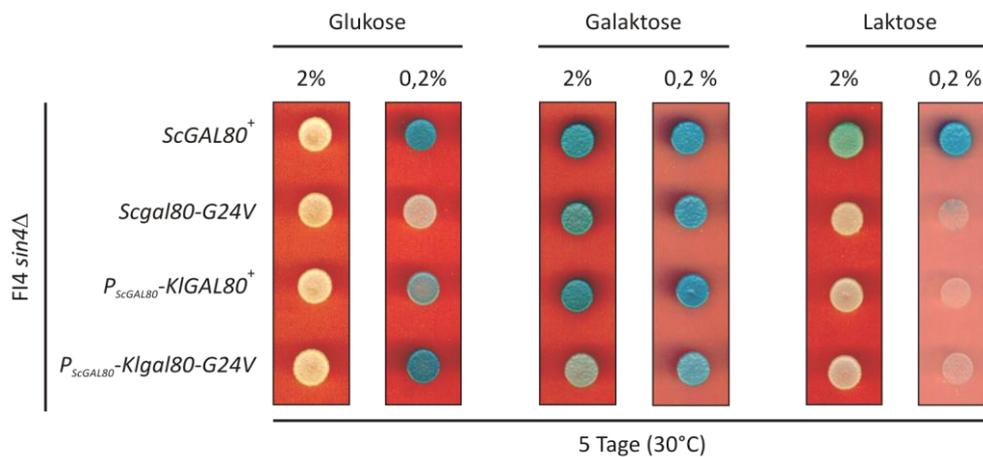


Abbildung 25. Einfluss der KIGAL80-Allele auf die LAC-Expression in *S. cerevisiae*.

Plattentest der *FI4 sin4Δ GAL80-* und *FI4 sin4Δ P_{ScGAL80}-KIGAL80-* Stämme auf Glukose-, Galaktose- und Laktose-haltigen Nährböden: *ScGAL80*⁺ und *Scgal80-G24V*. Bei *P_{ScGAL80}-KIGAL80*⁺ und *P_{ScGAL80}-Klgal80-G24V* handelt es sich um Fusionsgene, wodurch die *KIGAL80*-Allele vom *ScGAL80*-Promotor exprimiert werden. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug 2% und 0,2%. Die Nährböden wurden mit allen Aminosäuren supplementiert und mit X-Gal als Indikator für die *LAC*-Aktivität versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 30°C. Für den Plattentest wurde jeweils eine Einzelkolonie zuvor in 2% Glc-YEP bei 30°C für 14-16 h angezogen.

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Mutante *Scgal80-G24V* im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ eine schwächere *LAC*-Expression bei induzierenden Bedingungen (Galaktose) aufweist, was auf eine schwächere Interaktion von *ScGal80-G24V* mit *ScGal3* hindeuten könnte. Für die Mutante *Klgal80-G24V* konnte bei induzierenden Bedingungen eine schwächere *LAC*-Expression im Vergleich zu *KIGAL80*⁺ beobachtet werden (Abbildung 25). Dies könnte ebenfalls auf eine schwächere Interaktion von *KIGal80-G24V* mit *ScGal3* hindeuten. Auffällig ist, dass die für *Klgal80-G24V* bei Galaktose beobachtete *LAC*-Expression schwächer als die bei 0,2% Glukose beobachtete *LAC*-Expression war (Abbildung 25). Dies konnte aber nicht für *KIGAL80*⁺ beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die bei 0,2% Glukose für die *ScGAL80*-Allele beobachteten Phänotypen von *ScGAL3* abhängig sind (Abbildung 22). Dies sollte auch für die *KIGAL80*-Allele beobachteten Phänotypen zutreffen. Demnach würde der bei 0,2% Glukose beobachtete Phänotyp von *Klgal80-G24V* auf eine stärker affine Bindung von *KIGal80-G24V* an *ScGal3* in Abwesenheit von Galaktose und ATP hindeuten. Es ist gezeigt worden, dass die Bindung von *ScGal80* an *ScGal3* und

ScGal1 bzw. die Bindung von KIGal80 an KIGal1 durch Galaktose und ATP verstärkt wird (27; 40; 41). In diesem Zusammenhang ist eine Konformationsänderung von ScGal3, ScGal1 und KIGal1 durch die Bindung von Galaktose und ATP vorausgesagt worden (103; 104). Es wäre möglich, dass aufgrund einer Konformationsänderung von ScGal3 die Bindung von KIGal80-G24V an ScGal3 bei induzierenden Bedingungen im Vergleich zu nicht-induzierenden Bedingungen schwächer ist.

Unter induzierenden Bedingungen mit Laktose im Medium war für *KIGAL80⁺* und *Klgal80-G24V* keine LAC-Expression bzw. Wachstum² zu beobachten (Abbildung 25). Wie bereits unter 4.3.5 beschrieben ist die basale Transkription für die Induktion mit Laktose im Medium notwendig. Dass eine Induktion durch Laktose in *KIGAL80⁺* nicht ausreicht, deutet auf eine niedrigere basale Expression im Vergleich zu *ScGAL80⁺*. Eine niedrigere basale Expression von *KIGAL80⁺* könnte auf eine festere Bindung von KIGal80 im Vergleich zu ScGal80 an ScGal4 zurückzuführen sein.

Der bei 0,2% Glukose für die Mutante *Klgal80-G24V* beobachtete Phänotyp deutet auf eine schwächere Bindung von KIGal80-G24V im Vergleich zu KIGal80 und ScGal80 an ScGal4 hin (Abbildung 25). In der Mutante *Klgal80-G24V* sollte daher die basale Transkription im Vergleich zu *KIGAL80⁺* und *ScGAL80⁺* stärker sein und zur Laktose-Induktion führen. Dies konnte aber nicht beobachtet werden. Es wäre möglich, dass die schwächere Interaktion von KIGal80-G24V und ScGal3 unter induzierenden Bedingungen der günstigen basalen Transkription in der Mutante *Klgal80-G24V* überlagern könnte und nicht zur erwarteten Induktion führt (Abbildung 25).

In Tabelle A1 ist der Einfluss der in *ScGAL80* und *KIGAL80* eingeführten Mutationen auf die beobachtete LAC-Expression in *S. cerevisiae* zusammengefasst.

Anhand der in Abbildung 25 für *KIGAL80⁺* und *ScGAL80⁺* gezeigten Phänotypen können Informationen in Hinblick auf die Lokalisation der GAL-regulatorischen Proteine Gal80 und ScGal3 erhalten werden. Peng und Hopper (2000) haben gezeigt, dass ScGal80 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (48). Für ScGal3 konnte zunächst nur eine zytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden (48). Diese Befunde führten zur Annahme, dass ScGal80 und ScGal3 ausschließlich im Zytoplasma miteinander interagieren können. Durch die Einführung einer zusätzlichen NLS (Kernlokalisierungssignal-Sequenz) ist eine Lokalisation von ScGal80 im Zellkern forciert und eine schwächere Galaktose-Induktion im Reporterassay detektiert worden (48). Desweiteren ist die Galaktose-Induktion durch die Verankerung von ScGal3 in der Plasmamembran nicht beeinträchtigt, wonach ScGal3 nicht für die Induktion in den Zellkern gelangen muss (50). Anhand dieser Daten wurde von Peng und Hopper (2002) ein Modell vorgeschlagen, nach dem ScGal80 und ScGal3 im Zytoplasma miteinander interagieren, was bei der Galaktose-Induktion zu einer Reduktion der effektiven ScGal80-Konzentration im Zellkern führt, wodurch die Inhibierung von ScGal4 aufgehoben wird (50). Inzwischen ist in Galaktose-induzierten Zellen ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation von ScGal3 gezeigt und der ScGal3-ScGal80-Komplex nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Zellkern nachgewiesen worden (49). Wightman *et al.* (2008) schlugen ein Modell vor, nach dem ScGal3 im Galaktose- und ATP-gebundenem Zustand vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert und dort an ScGal80 bindet, wodurch die Inhibierung von ScGal4 aufgehoben wird (49). In unserem Labor ist für KIGal80 ausschließlich eine nukleäre Lokalisation gezeigt und inzwischen die

² Durch Hydrolyse ist Laktose zu einem geringen Anteil mit Glukose verunreinigt. Bei hohen Laktosekonzentrationen wird daher oft ein schwaches Wachstum von *Lac⁻* Stämmen beobachtet.

Kernlokalisierungssignal-Sequenz (NLS) von KlGal80 identifiziert worden (33; 105). Die Interaktion zwischen KlGal1, das zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert ist, und KlGal80 ist ausschließlich im Nukleus nachgewiesen worden (33). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von KlGal80 vom natürlichen *ScGAL80*-Promotor in *S. cerevisiae* keinen Einfluss auf die Induktion der *LAC*- und *GAL*-Gene (in Bezug auf das beobachtete Galaktose-Wachstum) hatte. Dieser Befund deutet zum einen auf ein Shutteln von ScGal3 zwischen Zytoplasma und Zellkern für die Galaktose-Induktion in *S. cerevisiae* hin und zum anderen, dass für die Galaktose-Induktion das Shutteln von Gal80 nicht unbedingt erforderlich ist. Diese Daten stützen das von Wightman *et al.* (2008) vorgeschlagene Modell (49).

5. Diskussion

5.1 Der Ligand beeinflusst die Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine

In *S. cerevisiae* und *K. lactis* wird die Transkription der GAL-Gene in Abhängigkeit von Galaktose durch die Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine, dem Aktivator Gal4, dem Repressor Gal80 und ScGal3 bzw. KlGal1, reguliert (siehe Einleitung). Unter nicht-induzierenden Bedingungen wird Gal4 durch Gal80, das an die TAD von Gal4 bindet, inhibiert. In Anwesenheit von Galaktose wird die Inhibierung von Gal4 durch die Bindung von ScGal3 bzw. KlGal1 an Gal80 aufgehoben. Die Komplexbildung von ScGal3-ScGal80 bzw. KlGal1-KlGal80 erfordert die Bindung von Galaktose und ATP an ScGal3 bzw. KlGal1 (27; 38). Der Mechanismus wie diese Interaktionen genau zustande kommen, ist aber noch nicht völlig verstanden. Die Vorhersage einer putativen Rossmann-Falte in Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* brachte die Fragen auf, ob Gal80 Dinukleotide binden kann, ob eine Dinukleotid-Bindung von Gal80 einen Einfluss auf die Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine und auf die Regulation des GAL-Transkriptionsschalters *in vivo* hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* Dinukleotide binden können (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Das *alignment* der Ko-Kristallstruktur von ScGal80, einem ScGal4-Peptid (AA 854-874) und NAD mit der Ko-Kristallstruktur von KlGal80 mit einem KlGal4-Peptid zeigt, dass die Dinukleotid-Bindung in KlGal80 und ScGal80 ähnlich erfolgen könnte (Abbildung 26.C). Für die Untersuchung, ob die Gal4-Gal80-Interaktion durch die Dinukleotid-Bindung von Gal80 beeinflusst wird, wurde in dieser Arbeit ein KlGal4-Peptid verwendet. Die Sequenz des KlGal4-Peptids enthält einen Bereich der TAD von KlGal4, der zwischen Gal4 aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* hoch konserviert ist und von beiden Gal80 gebunden wird (Abbildung 17) (23–26). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Bindung des KlGal4-Peptids die Dinukleotid-Bindung in Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* beeinflusst (siehe Abschnitt 4.2.4). Für KlGal80 wurde gezeigt, dass die Bindung des KlGal4-Peptids die Affinität von KlGal80 für NAD und NADP heruntersetzt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass auch die Bindung von NADP die Bindung des KlGal4-Peptids an KlGal80 negativ beeinflusst. Die für KlGal80 gezeigten *in vitro* Daten deuten auf eine Überlappung der Bindungsstellen für die Bindung des Dinukleotids und die Bindung von KlGal4-TAD in KlGal80 hin. Der Einfluss der Aminosäure-Austausche (Tryptophan 31, Histidin 99, Glycin 24) in KlGal80 auf die Bindung der TAD von KlGal4 wurde nicht untersucht. Wenn dieselben Aminosäurereste an der Bindung des Dinukleotids und der KlGal4-TAD beteiligt wären, sollten die KlGal80-Varianten eine geringere Affinität für KlGal4-TAD im Vergleich zum Wildtypprotein aufweisen. Der Ko-Kristallstruktur von KlGal80 mit einem KlGal4-Peptid kann zumindest entnommen werden, dass das Tryptophan 31 an der Bindung der TAD von KlGal4 beteiligt ist (Abbildung 26.B) (91). Dass auch das Histidin 99 und das Glycin 24 an der Bindung der TAD von KlGal4 beteiligt sein könnten, kann der Ko-Kristallstruktur nicht entnommen werden. Das von Thoden *et al.* (2008) für die Kristallisation eingesetzte KlGal4-Peptid war kleiner als das in dieser Arbeit verwendete KlGal4-Peptid und enthielt die Aminosäuren 847 bis 860 der TAD von KlGal4 (siehe Abschnitt 4.2.4). Die in der Ko-Kristallstruktur nicht enthaltenen letzten fünf Aminosäuren der KlGal4-TAD (AA 861-865) könnten auch durch das Glycin 24 gebunden werden.

Für ScGal80 konnte gezeigt werden, dass die Affinität von ScGal80 für NADP durch das KIGal4-Peptid vermindert ist (siehe Abschnitt 4.2.4). Dagegen hatte die Bindung des KIGal4-Peptids an ScGal80 keinen Einfluss auf die NAD-Bindung. Es konnte sogar eine leichte Verbesserung der NAD-Bindung von ScGal80 in Gegenwart des KIGal4-Peptids bestimmt werden. Pulldown-Experimente von Kumar *et al.* (2008) haben übereinstimmend gezeigt, dass NAD die Bindung von ScGal80 an GST-ScGal4, einem Fusionsprotein bestehend aus GST und der TAD von ScGal4 (AA 768-881), nicht beeinträchtigt (90). Die Ko-Kristallstruktur von ScGal80 mit NAD und einem ScGal4-Peptid (AA 854-874) zeigt, dass das Tryptophan 31 in ScGal80 sowohl an der Dinukleotid-Bindung, als auch an der Bindung der TAD von ScGal4 beteiligt ist (Abbildung 26.A) (90). Die Bindung des ScGal4-Peptids in der Spalte von ScGal80 ist ähnlich der Bindung des KIGal4-Peptids in der Spalte von KIGal80 (Abbildung 26.A und C). Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten und die von Kumar *et al.* (2008) publizierte Ko-Kristallstruktur von ScGal80 mit NAD und einem ScGal4-Peptid deuten auf eine zumindest teilweise Überlappung der Bindungsstellen für die Bindung des Dinukleotids und der TAD von ScGal4 in ScGal80 (90).

Durch gezielte Aminosäure-Austausche in KIGal80 konnte die Dinukleotid-Bindung beeinträchtigt (KIGal80-H99L) oder unterbunden (u.a. KIGal80-W31G und KIGal80-G24V) werden (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Die in KIGal80 substituierten Aminosäuren sind in Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* konserviert. Einen Einfluss von NADP auf die Bindung des KIGal4-Peptids konnte für KIGal80-W31G und KIGal80-G24V im Vergleich zu KIGal80 nicht detektiert werden (siehe Abschnitt 4.2.4). Dagegen konnte für die in der Dinukleotid-Bindung beeinträchtigten KIGal80-Varianten im Vergleich zu KIGal80 eine etwas schwächere Bindung an KIGal1 festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.2.4). Es ist wahrscheinlich, dass gleiche Aminosäure-Austausche in ScGal80 denselben Einfluss auf die Dinukleotid-Bindung haben. Kumar *et al.* (2008) haben ähnliche Aminosäure-Austausche in ScGal80 vorgenommen (u. a. ScGal80-H99A, ScGal80-W31A) (90). Im Pulldown-Experiment wurde ebenfalls für ScGal80 und ScGal80-H99A eine schwächere Bindung an GST-ScGal4 (AA 768-881) durch NADP detektiert (90). Dagegen war die Bindung von ScGal80-W31A an GST-ScGal4 (AA 768-881) nicht durch NADP beeinflusst. Von Kumar *et al.* (2008) wurden aber keine Untersuchungen des Einflusses der Aminosäure-Austausche in ScGal80 auf die Interaktion mit ScGal3 vorgenommen. Meyer *et al.* (1991) haben gezeigt, dass eine *ScGAL3*-Deletion durch *KIGAL1* in *S. cerevisiae* supprimiert wird (106). Dies deutet daraufhin, dass KIGal1 und KIGal80 bzw. ScGal3 und ScGal80 sehr ähnlich miteinander interagieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die Bindung der ScGal80-Varianten an ScGal3 analog zu der Bindung der KIGal80-Varianten an KIGal1 *in vitro* beeinträchtigt sein könnte.

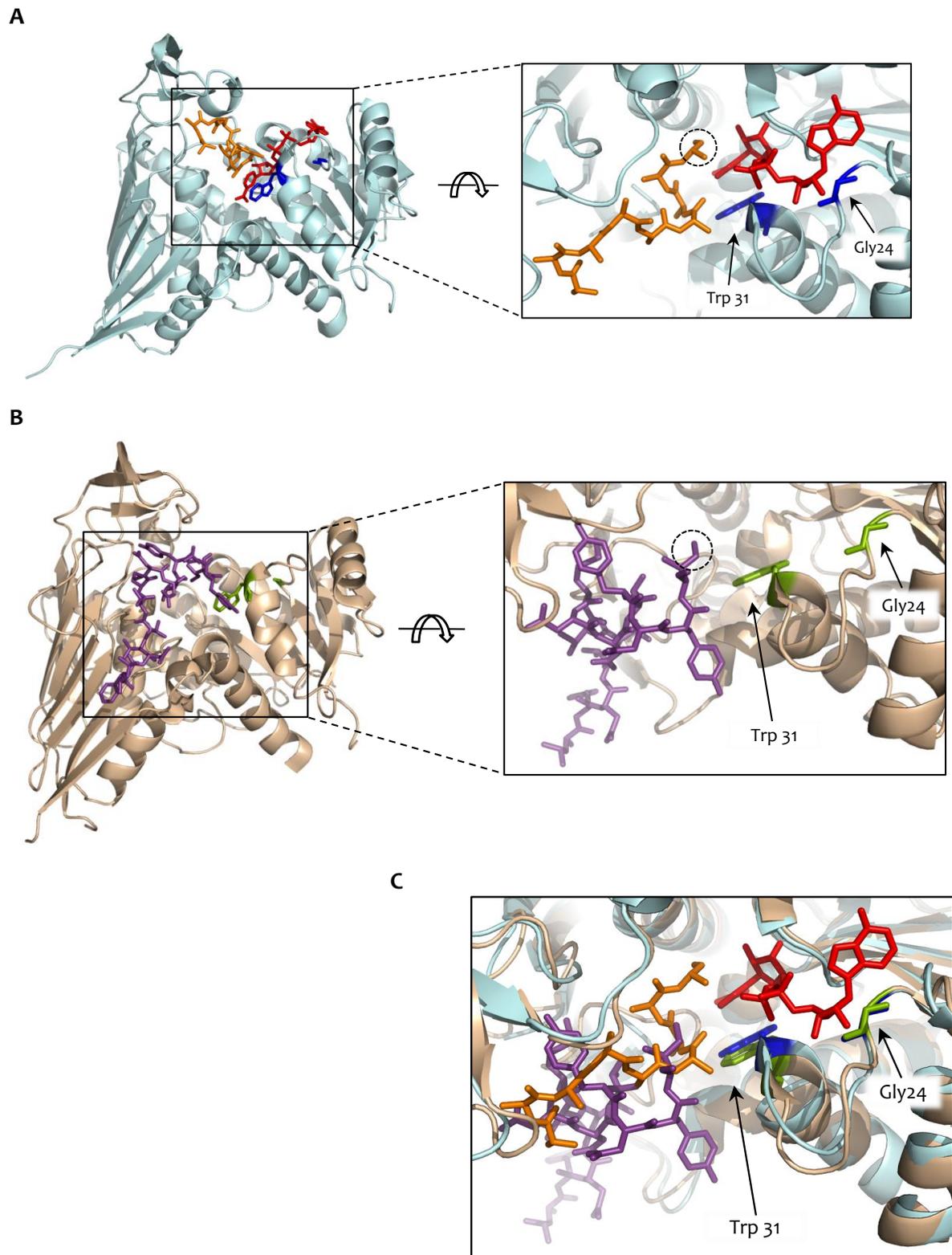


Abbildung 26. Ko-Kristallstruktur von ScGal80 und KIGal80 und einem Gal4-Peptid.

A. Ko-Kristallstruktur des ScGal80-Monomers (hellblau, Trp 31 und Gly 24 sind blau hervorgehoben) mit NAD (rot) und einem ScGal4-Peptid (orange). **B.** Ko-Kristallstruktur des KIGal80-Monomers (sandfarben, Trp 31 und Gly 24 sind grün hervorgehoben) und einem KIGal4-Peptid (lila). **C.** *Alignment* der Ko-Kristallstrukturen von ScGal80 (A) und KIGal80 (B). NAD, das Gal4-Peptid und das an der Dinukleotid-Bindung beteiligte Tryptophan 31 und Glycin 24 sind als *sticks* dargestellt. Für die Orientierung des Gal4-Peptids ist die C-terminale Aminosäure des Gal4-Peptids eingekreist (A und B). Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 3BTS für ScGal80 und 3E1K für KIGal80) entnommen und mit dem Programm PyMol (DeLano) erstellt.

5.2 Die Liganden-Bindung von Gal80 beeinflusst die Gal4-Aktivität

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen des Einflusses der Aminosäure-Austausche in Gal80 auf die Inhibierung und Aufhebung der Inhibierung von Gal4 *in vivo*. Dafür wurden Untersuchungen bei induzierenden Bedingungen (Galaktose, Laktose) und nicht-reprimierenden Bedingungen (niedrige Glukosekonzentration) vorgenommen. In der Arbeit wurde stets von beobachteter LAC-Expression (gleichzusetzen mit Gal4-Aktivität) bei niedrigen Glukosekonzentrationen gesprochen. Diese beobachtete Gal4-Aktivität kann auf eine basale Transkription der GAL-Gene zurückgeführt werden, da es sich um nicht-induzierende und nicht-reprimierende Bedingungen handelte. Für die in den Abschnitten 4.3.2 bis 4.3.5 für die *ScGAL80*-Allele vorgestellten Phänotypen konnte ein Einfluss der Mutationen in ScGal80 sowohl auf die Inhibierung von ScGal4 als auch auf die Aufhebung der Inhibierung von ScGal4 durch ScGal3 festgestellt werden (siehe auch Tabelle A1). Für die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* konnten im Vergleich zu *ScGAL80*⁺ nur leichte bzw. keine ScGal4-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen und keine ScGal4-Aktivität bei der Laktose-Induktion (wahrscheinlich aufgrund einer niedrigeren basalen Transkription) beobachtet werden. Eine schwächere ScGal4-Aktivität deutet auf eine festere Bindung an ScGal4 von ScGal80-H99L und ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 hin. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der Ligand die Bindung von ScGal80 an ScGal4 schwächt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Ligand einen Einfluss auf die Bindung von ScGal4 an ScGal80 hat (siehe Abschnitt 4.2.4). Infolgedessen erscheint es wahrscheinlich, dass der Ligand auch einen Einfluss auf die ScGal4-ScGal80-Interaktion *in vivo* hat. Die ebenfalls nicht zur Dinukleotid-Bindung fähige ScGal80-W31G-Variante inhibierte im Vergleich zu ScGal80-G24V nur schwach ScGal4. Demnach scheint das Tryptophan 31, im Gegensatz zum Glycin 24, an der Bindung der TAD von ScGal4 beteiligt zu sein (Abbildung 26.A). Nach Angaben von Kumar *et al.* (2008) inhibierten alle ScGal80-Varianten, einschließlich ScGal80-W31A, vollständig im nicht-induzierten Zustand (90).

Es konnte gezeigt werden, dass die bei niedrigen Glukosekonzentrationen für die *ScGAL80*-Allele beobachteten Phänotypen von *ScGAL3* abhängig sind (siehe Abschnitt 4.3.3). Bei induzierenden Bedingungen (Galaktose) erreichten im *ScGAL3*⁺-Hintergrund die Mutanten *Scgal80-H99L* und *Scgal80-G24V* nicht das Niveau von *ScGAL80*⁺, was auf eine schwächere Bindung an ScGal3 der ScGal80-Varianten im Vergleich zu ScGal80 hindeutet. Dies sollte vermutlich auch für die Interaktion von ScGal80-H99L und ScGal80-G24V mit ScGal3 bei niedrigen Glukosekonzentrationen zutreffen. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der Ligand die Bindung von ScGal80 an ScGal3 begünstigt. Eine durch den Liganden begünstigte ScGal3-ScGal80-Interaktion ist nicht im Widerspruch mit einer durch den Liganden geschwächten ScGal4-ScGal80-Interaktion. Beides begünstigt ScGal4-Aktivität. Im *Scgal3*Δ-Hintergrund wurde ein besseres Wachstum und stärkere Induktion der *Scgal80*-Mutanten gegenüber *ScGAL80*⁺ beobachtet, was auf eine festere Bindung der ScGal80-Varianten gegenüber ScGal80 an ScGal1 zurückzuführen sein könnte (siehe Abschnitt 4.3.3). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der Ligand die Bindung von ScGal80 an ScGal1 schwächt. Eine festere Bindung der ScGal80-Varianten im Vergleich zu ScGal80 an ScGal1 führt zur Inhibierung der Galaktokinase und könnte auch das niedrigere Niveau der enzymatischen Aktivität in den Mutanten *Scgal80-H99L*- und *Scgal80-G24V* im *ScGAL3*⁺-Hintergrund erklären. Eine festere Bindung dieser ScGal80-Varianten im Vergleich zu ScGal80 an ScGal1 würde eine schwächere Bindung dieser ScGal80-Varianten im Vergleich zu ScGal80 an ScGal3 bedeuten. Im Umkehrschluss ist

eine durch den Liganden geschwächte ScGal1-ScGal80-Interaktion nicht im Widerspruch mit einer durch den Liganden begünstigten ScGal3-ScGal80-Interaktion. Beides beeinträchtigt nicht die Induktion der *GAL*-Gene und die Metabolisierung von Galaktose.

Anhand der publizierten Kristallstruktur von ScGal80 und vorangegangenen Mutationsstudien gibt es Anhaltspunkte, dass die Bindung von ScGal3 an ScGal80 im Bereich des Liganden erfolgen könnte. Es sind Mutationen in ScGal80 bekannt, die sowohl die Bindung von ScGal3 als auch die Bindung von ScGal4 beeinträchtigen (Abbildung 27) (32; 88). Dies könnte auch für die ScGal1-ScGal80-Interaktion zutreffen. Es kann nicht zwischen definierten Bindungsstellen in ScGal80 für die Bindung von ScGal3 bzw. ScGal1 oder ScGal4 unterschieden werden. Es ist aber möglich, in ScGal80 Bereiche einzugrenzen, in denen Mutationen die Bindung an ScGal3 stärker als die Bindung an ScGal4 und umgekehrt beeinträchtigen. Mutationen in der Rossmann-Falte von ScGal80 beeinträchtigen stärker die Bindung an ScGal3 und Mutationen in der Nähe der Spalte von ScGal80 stärker die Bindung an ScGal4 (Abbildung 27). Die Mutationen in der Rossmann-Falte könnten auf eine Bindung von ScGal3 und ScGal1 in der Nähe des Liganden an ScGal80 hinweisen. Demnach kann nicht prinzipiell ein Einfluss des Liganden sowohl auf die ScGal3-ScGal80-Interaktion, als auch auf die ScGal1-ScGal80-Interaktion ausgeschlossen werden. Der Ligand könnte in die Bindung von ScGal80 an ScGal3 beteiligt sein und andererseits die Bindung von ScGal80 an ScGal1 beeinträchtigen. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde räumen diese Möglichkeit der Modulierung der Affinität von ScGal80 gegenüber ScGal3 und ScGal1 durch den Liganden ein. Um dies *in vitro* nachzuweisen, müsste die Komplexbildung von ScGal3-ScGal80 und ScGal1-ScGal80 in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration untersucht werden. Eine Modulierung der Affinität von ScGal80 für ScGal3 und ScGal1 durch den Liganden könnte erklären, warum ScGal3 nur schwach, unter Bedingungen wo ScGal80 den Liganden nicht gebunden hat, gegen die ScGal1-ScGal80-Interaktion *in vitro* kompetitiert (107).

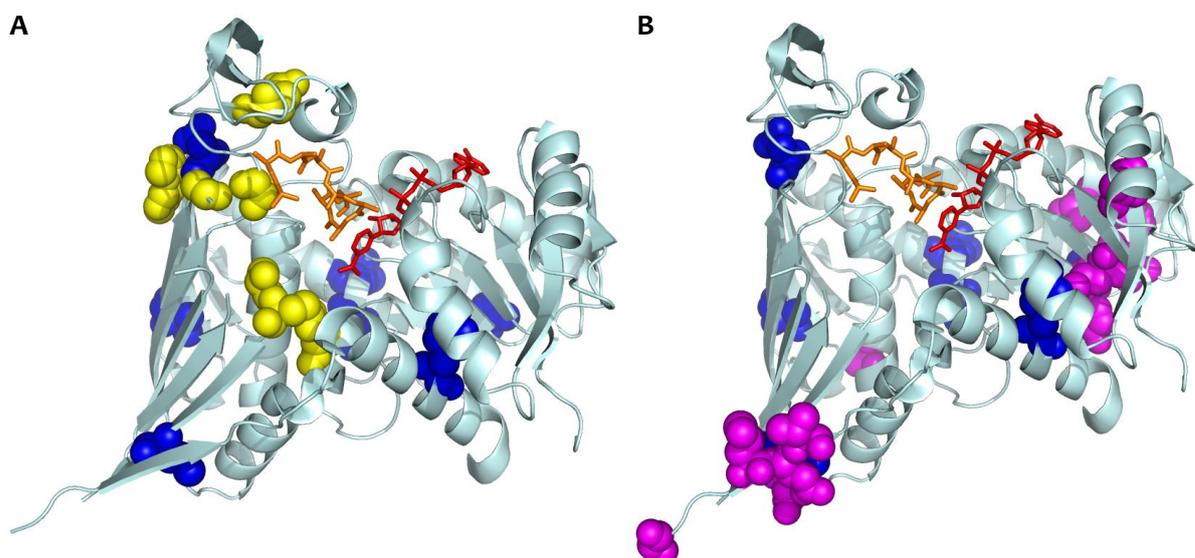


Abbildung 27. Lokalisation von Mutationen in ScGal80, die die ScGal3- und ScGal4-Bindung beeinträchtigen.

Ko-Kristallstruktur des ScGal80-Monomers (hellblau) mit NAD (rot) und einem ScGal4-Peptid (orange). **A.** Mutationen, die die Bindung an ScGal4 beeinträchtigen sind als *spheres* gelb dargestellt. **B.** Mutationen, die die Bindung an ScGal3 beeinträchtigen sind als *spheres* magenta dargestellt. **A.-B.** Mutationen, die sowohl die ScGal4- als auch die ScGal3-Bindung beeinträchtigen sind als *spheres* blau dargestellt (32; 88). Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 3BTS) entnommen und mit dem Programm PyMol (DeLano) erstellt.

Eine Modulierung der Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine durch den Liganden könnte auch für *K. lactis* zutreffen. Die GAL-regulatorischen Proteine Gal4 und Gal80 sind zwischen *S. cerevisiae* und *K. lactis* austauschbar. Es wurde gezeigt, dass ScGal4 und KlGal4 die jeweilige GAL4-Deletion *in vivo* komplementieren, und dass ScGal80 und KlGal80 Gal4 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* inhibieren können (11; 12; 25; 27). In der hier vorliegenden Arbeit konnte ScGal80 in *S. cerevisiae* durch KlGal80 ersetzt werden, indem KlGal80 vom natürlichen ScGAL80-Promotor exprimiert wurde (siehe Abschnitt 4.3.6). Für *KIGAL80*⁺ konnte wie für *ScGAL80*⁺ im Vergleich zur Mutante *Scgal80-G24V* ScGal4-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen detektiert werden (Abschnitt 4.3.6 und Tabelle A1). Dies deutet hier auf eine schwächere Bindung von KlGal80 an ScGal4 durch den Liganden hin. Zudem war die durch Galaktose bedingte Induktion in *KIGAL80*⁺ und *ScGAL80*⁺ gleich, was auf eine gleich starke Interaktion von KlGal80 und ScGal80 mit ScGal3 in *S. cerevisiae* hindeutet. Meyer *et al.* (1991) zeigten, dass *KIGAL1* eine *ScGAL3*-Deletion in *S. cerevisiae* komplementiert und den *long-term-adaption*-Phänotyp supprimiert, was auf eine gleich starke Bindung von KlGal80 und ScGal80 an KlGal1p hinweist (106). Zusammengefasst weisen die in dieser Arbeit und die von Meyer *et al.* (1991) vorliegenden Daten auf vergleichbare Interaktionen von ScGal80 und KlGal80 mit ScGal4, ScGal3 und KlGal1 in *S. cerevisiae* hin. Bei induzierenden Bedingungen (Galaktose) erreichte die Mutante *KlGal80-G24V* (wie auch *Scgal80-G24V*) nicht das Niveau von *KIGAL80*⁺ (bzw. *ScGAL80*⁺). Dies deutet auf eine schwächere Bindung von KlGal80-G24V (wie auch von ScGal80-G24V) im Vergleich zu KlGal80 (bzw. ScGal80) an ScGal3 hin. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der Ligand nicht nur die Bindung von ScGal80, sondern auch die Bindung von KlGal80 an ScGal3 begünstigen könnte. Dies könnte auch für die Bindung von KlGal80 und ScGal80 an KlGal1 zutreffen.

Anders als *KIGAL80*⁺ verhielt sich *KlGal80-G24V* nicht wie *Scgal80-G24V* in *S. cerevisiae* (siehe Abschnitt 4.3.6 und Tabelle A1). Die Mutante *KlGal80-G24V* wies im Vergleich zur Mutante *Scgal80-G24V* starke ScGal4-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen auf, was auf eine schwächere Inhibierung von ScGal4 durch KlGal80-G24V hindeutet. Dieser Befund und die *in vitro*-Daten deuten daraufhin, dass in ScGal80 und KlGal80 die Bindung der Gal4-TAD unterschiedlich erfolgt. Konformative Unterschiede der gebundenen Transaktivierungsdomäne und Unterschiede in den Kontaktstellen zwischen der Transaktivierungsdomäne und Gal80 sind möglich, auch wenn der Austausch der TAD von ScGal4 und KlGal4 keinen Einfluss auf die Repression und Induktion in *S. cerevisiae* hat (25). Da Struktur, Spezifität und Affinität von Transaktivierungsdomänen durch die Interaktion mit dem Repressor bestimmt werden, wäre eine Ko-Kristallisation von Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* mit beiden Transaktivierungsdomänen von ScGal4 und KlGal4 als Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten interessant.

5.3 Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* binden Dinukleotide mit unterschiedlicher Affinität

Im Abschnitt 4.2.1 wurde gezeigt, dass Gal80 aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* Dinukleotide mit unterschiedlicher Affinität binden können. Für KlGal80 wurde ein apparenter K_D -Wert für die KlGal80-NAD-Interaktion von $6,1 \times 10^{-1}$ mM und für die KlGal80-NADP-Interaktion von $2,1 \times 10^{-1}$ mM ermittelt. ScGal80 bindet mit einem apparenten K_D -Wert von $15,2 \times 10^{-3}$ mM NAD und mit $2,5 \times 10^{-3}$ mM NADP. Die unterschiedlichen Affinitäten von ScGal80 und KlGal80 für den Liganden können Unterschiede in den intrazellulären Konzentrationen der Dinukleotide zwischen den Hefen

widerspiegeln. Unterschiede im Metabolismus von *S. cerevisiae* und *K. lactis* sind bekannt. In Hefe wird Glukose durch die Glykolyse und den Pentosephosphatweg metabolisiert. Der Pentosephosphatweg, in dem zytosolisches NADP zu NADPH reduziert wird, ist in *K. lactis* effektiver als in *S. cerevisiae* (108). Desweiteren besitzt *K. lactis* eine in der Mitochondrien-Membran verankerte NADPH-Dehydrogenase, die zytosolisches NADPH oxidiert (109).

Proteine, die zwischen reduzierten und oxidierten Dinukleotiden unterscheiden und Änderungen von NAD:NADH und NADPH:NADP in der Zelle wahrnehmen können, wurden als Redoxsensoren beschrieben (110; 111). Das NADP(H)-Sensorprotein HSCARG bindet NADPH um einen Faktor von 360 stärker als NADP (86). Das NAD(H)-Sensorprotein CtBP bindet NADH um einen Faktor >100 stärker als NAD (112). Die reduzierten Dinukleotide wurden von ScGal80 und KIGal80 nur um einen Faktor von 3-5 schwächer als die oxidierten Dinukleotide gebunden. Dieser Unterschied erscheint zu klein, als dass Gal80 durch den Redox-Status der Zelle reguliert werden würde. Für *S. cerevisiae* sind intrazelluläre Konzentrationen für NAD von 1-3 mM und für NADH von 0,8-1,5 mM bei Standard Wachstumsbedingungen bestimmt worden (113–117). Die Konzentrationen der phosphorylierten Äquivalente von NAD und NADH sind in der Zelle niedriger. Für NADPH sind intrazelluläre Konzentrationen von 0,2-0,5 mM³ und für NADP von 0,02-0,1 mM³ bestimmt worden (117; 119). Für *K. lactis* konnten keine Angaben zur Konzentration der Dinukleotide oder deren Verhältnisse in der Literatur gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Konzentration von NAD und NADP von *K. lactis* bestimmt werden. Hierzu wurde eine Metaboliten-Extraktion von *K. lactis*-Zellen mittels Trichloressigsäure nach Bedalov *et al.* (2003) vorgenommen (116). Die Bestimmung der im Metaboliten-Extrakt enthaltenen Konzentration von NAD und NADP sollte in einem enzymatischen Test (Alkohol-Dehydrogenase zur Bestimmung von NAD, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur Bestimmung von NADP) erfolgen. Es konnte weder NAD noch NADP im Metaboliten-Extrakt nachgewiesen werden. Alternative Methoden zur Metaboliten-Extraktion sind in unserem Labor noch nicht getestet worden. Die für *S. cerevisiae* bestimmten intrazellulären Konzentrationen der Dinukleotide spiegeln aber nicht die Konzentrationen der im Zytosol und im Zellkern frei verfügbaren Dinukleotide wider. Die Konzentrationen der frei verfügbaren Dinukleotide sind niedriger als die in der Literatur angegebenen Konzentrationen.

Für KIGal80 ist eine ausschließlich nukleäre Lokalisation gezeigt (71). ScGal80 ist sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert (48). Die frei verfügbaren Dinukleotide sollten auf Grund ihrer kleinen molaren Masse durch die Poren der Kernmembran diffundieren können. Demnach sollten die Konzentrationen der frei verfügbaren Dinukleotide im Zytoplasma auch die Konzentrationen der frei verfügbaren Dinukleotide im Zellkern widerspiegeln. Auf Grund der ermittelten Dissoziationskonstanten von Gal80 für NAD und NADP ist es vorstellbar, dass Gal80 in der Zelle NAD oder NADP gebunden hat. An dieser Stelle soll noch einmal auf die in Abschnitt 4.3.6 in *S. cerevisiae* beobachteten Phänotypen der Wildtypallele *ScGAL80*⁺ und *KIGAL80*⁺ hingewiesen werden, da diese eine Korrelation mit den für ScGal80 und KIGal80 ermittelten Affinitäten für den Liganden zeigten.

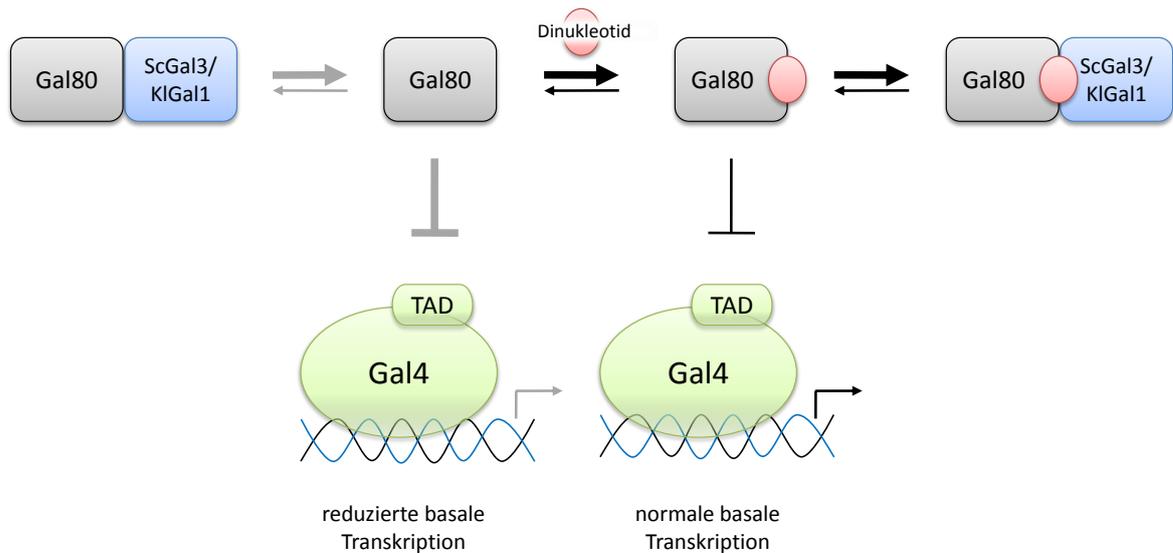
³ NADP(H)-Konzentrationen wurden in $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Trockengewicht) angegeben. Die Umrechnung in mM erfolgte mit einem Faktor von 2,38 ml für das intrazelluläre Volumen pro Gramm Trockengewicht nach Ditzelmüller *et al.* (1983), (118).

5.4 Modellvorstellung zur Modulierung des GAL-Transkriptionsschalters durch den Liganden

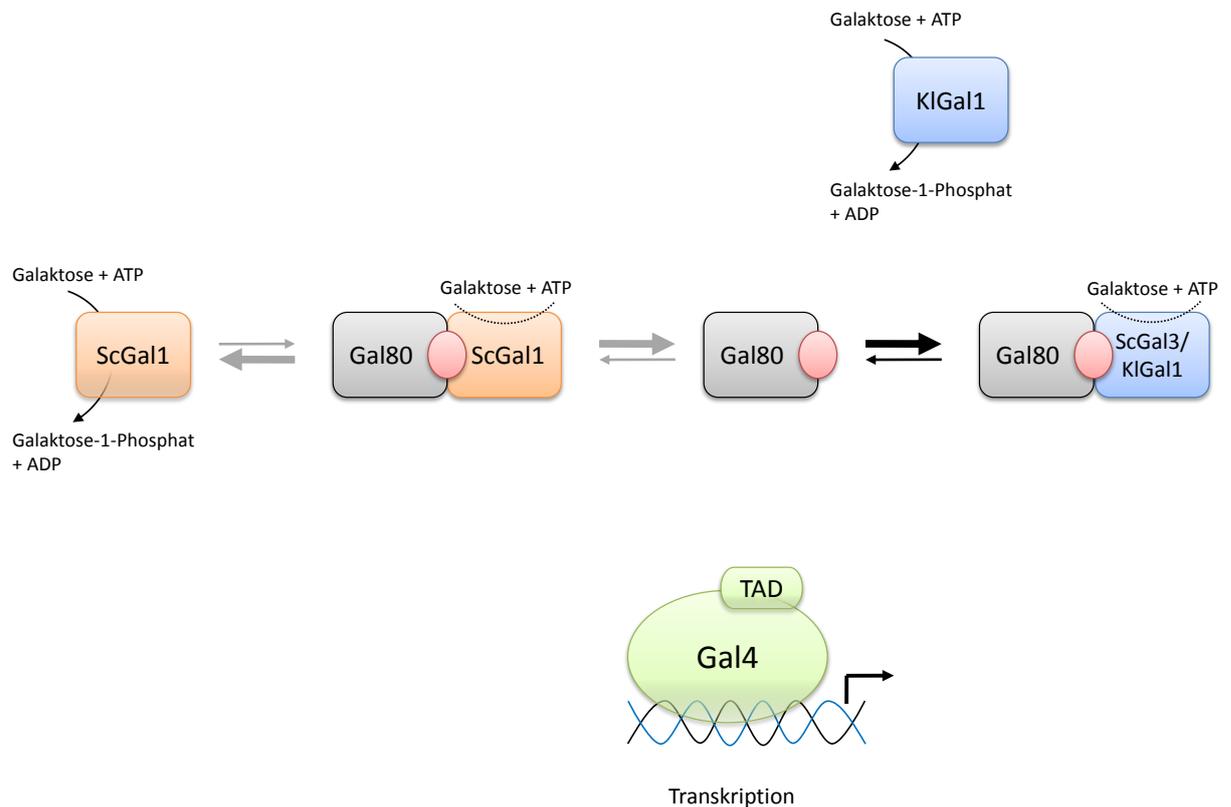
Kumar *et. al.* (2008) beobachteten mit ähnlichen *ScGAL80*-Mutanten-Stämmen eine schnellere Induktion der *ScGAL1*-Expression, die aber dasselbe Niveau von *ScGAL80*⁺ erreicht haben sollen, und schlugen vor, dass der Ligand die Geschwindigkeit des anfänglichen Induktionsereignissen bestimmt (90). In diesem Zusammenhang spekulierten Kumar *et. al.* (2008), dass ScGal80 von einem NAD-gebundenen Zustand (begünstigt die Bindung an ScGal4) in einen NADP-gebundenen Zustand (schwächt die Bindung an ScGal4) beim Wechsel von nicht-induzierenden zu induzierenden Bedingungen übergeht und ScGal80 schneller von ScGal4 dissoziiert. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von beiden Gal80 NAD gegenüber NADP nur um einen Faktor von 3-6 schwächer gebunden wird. Dieser Faktor erscheint zu klein, als dass eine Regulation von Gal80 durch NAD und NADP erfolgen könnte. Ebenso weisen die gezeigten Ergebnisse nicht auf eine derartige Feinregulierung des GAL-Transkriptionsschalters durch den Liganden hin. *In vitro* konnte zwar ein positiver Einfluss der TAD von KlGal4 auf die NAD-Bindung von ScGal80 festgestellt werden, es gibt aber derzeit keine Anhaltspunkte, dass NAD die ScGal4-ScGal80-Interaktion stabilisieren könnte. Im Gegenteil, die in der Dinukleotid-Bindung beeinträchtigten ScGal80-Varianten (ScGal80-H99L und ScGal80-G24V) zeigten eine stärkere Inhibierung von ScGal4 im Vergleich zum Wildtypprotein.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten favorisieren eine Modell, nach dem Gal80 nicht als Sensor zwischen NAD(H) und NADP(H) diskriminiert, sondern die Dinukleotid-Bindung von Gal80 für eine unvollständige Inhibierung von Gal4 für die basale Transkription der *GAL/MEL*- bzw. *GAL/LAC*-Gene und für eine vollständige Induktion der *GAL*-Gene erforderlich sein könnte (Schema 4). Die unvollständige Inhibierung von Gal4 durch die Dinukleotid-Bindung von Gal80 ist nach dieser Modellvorstellung von ScGal3 bzw. KlGal1 abhängig. Durch die Dinukleotid-Bindung von Gal80 würde die ScGal3-Gal80-Interaktion bzw. KlGal1-Gal80-Interaktion begünstigt, wodurch ein höheres Niveau bei der Induktion erzielt würde. Gleichzeitig würde im Zuge der Galaktose-Induktion in *S. cerevisiae* die Bindung von Gal80 an ScGal3 durch die Dinukleotid-Bindung gegenüber ScGal1 bevorzugt, wodurch die Galaktokinase-Funktion von ScGal1 nicht inhibiert würde. In *K. lactis* ist die Funktion des Regulators von KlGal80 und der Galaktokinase in KlGal1 vereinigt. Da ebenfalls die Galaktokinase-Funktion von KlGal1 im KlGal80-gebundenen Zustand inaktiv ist, muss KlGal1 in *K. lactis* stärker induziert werden, damit KlGal1 durch KlGal80 nicht austitriert würde (33; 71).

A



B



Schema 4. Hypothetisches Modell zur Regulation des GAL-Transkriptionsschalters durch den Liganden.

A. Nicht-reprimierende Bedingungen: Gal80 liegt vorrangig im Dinukleotid-gebundenen Zustand in der Zelle vor. Die vom Gal80-NAD-Komplex vermittelte Inhibition der Transaktivierungsdomäne (TAD) von Gal4 ist im Vergleich zur Gal80-vermittelten Inhibition schwächer und führt zu einer stärkeren basalen Transkription, die zudem von ScGal3/KIGal1 durch Bildung eines ScGal3/KIGal1-NAD-Gal80-Komplexes abhängig ist. **B.** Induzierende Bedingungen: Die Inhibition der TAD von Gal4 durch den NAD-Gal80-Komplex wird durch Bildung eines ScGal3/KIGal1-NAD-Gal80-Komplexes aufgehoben. In *S. cerevisiae* bildet sich nur ein schwacher ScGal1-NAD-Gal80-Komplex, wodurch die Galaktokinase-Aktivität von ScGal1 inhibiert wird. (Bevorzugte Gleichgewichte sind schwarz gekennzeichnet sowie durch stärkere Pfeile/Symbole hervorgehoben.)

5.5 Metabolite beeinflussen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren

Die grundlegenden Mechanismen der Genregulation sind weitestgehend bekannt. Es ist aber noch nicht verstanden, wie das „An“- und „Abschalten“ von Genen oder eine Feinregulierung der Transkription in Abhängigkeit von veränderten Bedingungen (z.B. Nährstoffangebot) erfolgt. Ein direkter Einfluss von Metaboliten auf die Regulation der Expression ist in Prokaryoten lange bekannt. Zum Beispiel wird in *E. coli* die Aktivität des *lac*-Repressors durch Laktose reguliert (siehe Einleitung). In Eukaryoten konnte erst in den letzten Jahren ein direkter Einfluss von Metaboliten auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Put3, ein Transkriptionsaktivator in *S. cerevisiae*, bindet als Dimer an UAS-Elemente stromabwärts von *PUT1* und *PUT2*. *PUT1* und *PUT2* kodieren Enzyme, die für die Umwandlung von Prolin in Glutamat notwendig sind. In Abhängigkeit von der verfügbaren Stickstoffquelle und der intrazellulären Prolin-Konzentration, bindet Put3 Prolin. Dies führt zu einer Konformationsänderung und Freisetzung der TAD von Put3, wodurch die Transkription von *PUT1* und *PUT2* aktiviert wird (120). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung eines Metaboliten reguliert wird ist Hap1. In Abhängigkeit von der Häm-Konzentration aktiviert oder reprimiert Hap1 die Transkription einer Reihe von Genen in *S. cerevisiae* (121). Die Regulation der *GAL*-Gene erfolgt in Abhängigkeit von dem Metabolit Galaktose, der nicht mit dem Repressor Gal80 oder dem Transkriptionsaktivator Gal4, sondern mit ScGal3 bzw. KlGal1 interagiert. Die Modelle besagen, dass die Interaktion von Gal3 bzw. KlGal1 mit Gal80 in Abhängigkeit von Galaktose essentiell für die Transkriptionsaktivierung der *GAL*-Gene ist (121). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein weiterer Metabolit (NAD(P)), der direkt an den Repressor Gal80 bindet, die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsaktivator Gal4, aber auch wahrscheinlich mit ScGal3 und KlGal1, beeinflusst. Damit wäre ein weiterer Fall von Regulation direkt an der DNA wirkender Transkriptionsfaktoren durch kleine Metabolite beschrieben. Um Genregulation auf molekularer Ebene richtig verstehen zu können, ist es erforderlich den direkten Einfluss von Metaboliten auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren in zukünftigen Forschungsarbeiten zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

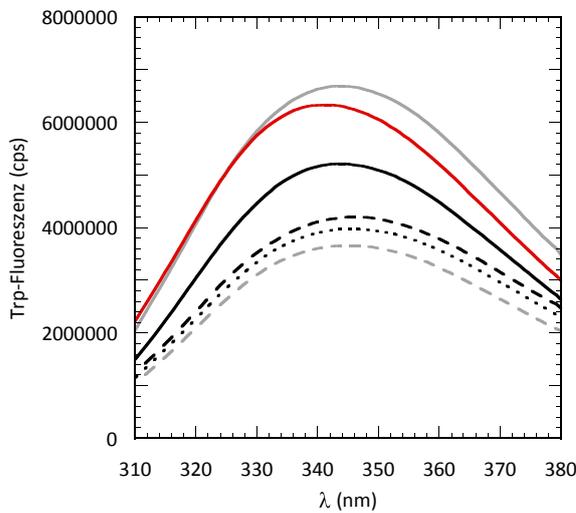
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Gal80 aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* Dinukleotide binden können und ob dies einen Einfluss auf die Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine sowie auf die Regulation des GAL-Transkriptionsschalters *in vivo* hat. Mittels verschiedener biophysikalischer Methoden (Fluoreszenzspektroskopie, isothermale Titrationskalorimetrie, Zirkulardichroismus, analytische Ultrazentrifugation, *stopped-flow*-Spektroskopie) wurde die Dinukleotid-Bindung von ScGal80 und KlGal80 nachgewiesen und umfassend charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass ScGal80 Dinukleotide mit viel höherer Affinität als KlGal80 binden kann. Beide Gal80 binden NADP mit höherer Affinität als NAD und die oxidierten mit höherer Affinität als die reduzierten Dinukleotide. Für KlGal80 wurde gezeigt, dass die Dinukleotid-Bindung keinen erkennbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur und die Dimerisierung hat. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass einzelne Aminosäure-Austausche in KlGal80, die die Dinukleotid-Bindung beeinflussen, keinen erkennbaren Einfluss auf die Gesamt-Sekundärstruktur hatten.

Durch Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Durchführung von Galaktokinase-Inhibierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Transaktivierungsdomäne von KlGal4 die Bindung von NAD und NADP in KlGal80 beeinträchtigt. Für ScGal80 wurde gezeigt, dass die Bindung der Transaktivierungsdomäne von Gal4 die Bindung von NADP aber nicht die von NAD beeinträchtigt. Diese Daten deuten auf eine stärkere Überlappung der Bindungsstellen für die Bindung der Transaktivierungsdomäne von Gal4 und des Dinukleotids in KlGal80 im Vergleich zu ScGal80 hin. *In vivo*-Untersuchungen in *S. cerevisiae* bestätigten diese Befunde. Die nicht mehr zur Dinukleotid-Bindung fähige Variante KlGal80-G24V inhibierte im Vergleich zur homologen Variante ScGal80-G24V nur schwach ScGal4. Mit Hilfe des Galaktokinase-Inhibierungsexperiments konnte gezeigt werden, dass die Dinukleotid-Bindung von KlGal80 keinen negativen Einfluss auf die Inhibierung von KlGal1 hat. Dagegen wurde eine etwas schwächere Interaktion für die Variante KlGal80-G24V mit KlGal1 detektiert. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die homologen Mutanten *gal80-G24V* nicht das selbe Niveau bei der Induktion wie die *GAL80⁺*-Stämme erreichten. Dieser Befund deutet auf eine schwächere Interaktion der Varianten Gal80-G24V im Vergleich zu Gal80 mit ScGal3.

Bei nicht-reprimierenden Bedingungen (niedrigen Glukosekonzentrationen) wurde eine basale LAC-Expression (Gal4-Aktivität) in *S. cerevisiae* und *K. lactis* detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass die beobachtete basale LAC-Expression in *S. cerevisiae* und *K. lactis* von ScGal3 bzw. KlGal1 abhängig ist. Anhand dieser Befunde konnte erstmalig eine biologische Funktion der Bindung von ScGal3 bzw. KlGal1, unabhängig von Galaktose und ATP, an Gal80 zur Regulation der Gal4-Aktivität gezeigt werden. Die fehlende Dinukleotid-Bindung von ScGal80 führte zu einer reduzierten basalen LAC-Expression in der Mutante *Scgal80-G24V*. Dies deutet auf eine festere Bindung der Variante ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 an ScGal4 hin. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Mutante *Scgal80-G24V* den *long-term-adaption*-Phänotyp im *Scgal3Δ*-Hintergrund supprimierte, was auf eine festere Bindung von ScGal80-G24V im Vergleich zu ScGal80 an ScGal1 hinweist.

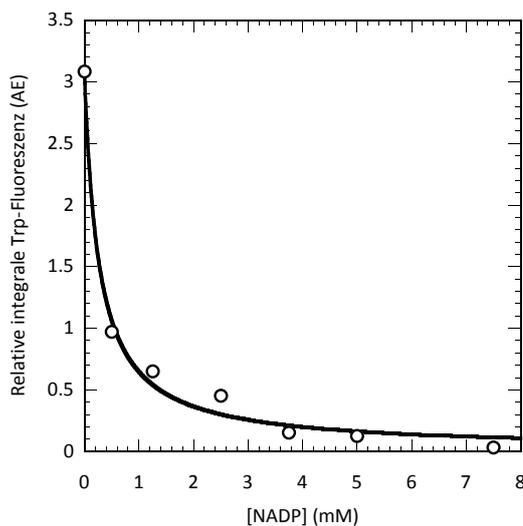
Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde eine Modulierung der Interaktion der GAL-regulatorischen Proteine durch die Dinukleotid-Bindung von Gal80 in *S. cerevisiae* und *K. lactis* vorgeschlagen. Hierbei würde die Dinukleotid-Bindung von Gal80 zu einer schwächeren Bindung an Gal4 und zu einer stärkeren Bindung an ScGal3 bzw. KlGal1 führen. In *S. cerevisiae* würde die Dinukleotid-Bindung von Gal80 die Bindung an ScGal1 schwächen, wodurch die enzymatische Funktion von ScGal1 nicht inhibiert wird.

7. Anhang



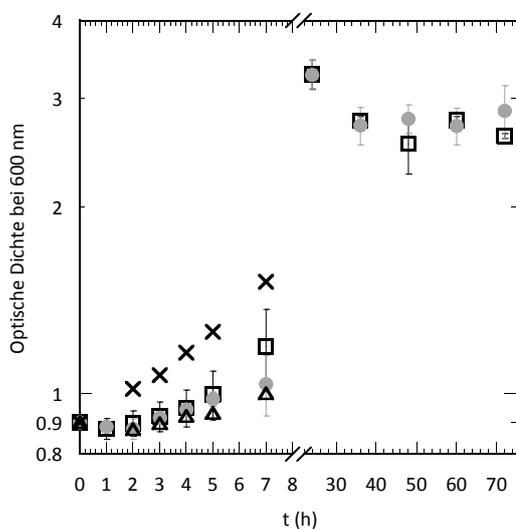
Anhang A1. Fluoreszenzspektren der K1Gal80-Varianten.

Korrigierte Tryptophanfluoreszenz von NHK1Gal80 (—), -G24V (---), -W31G (---), -D88A (---), -H99L (---) und E122G (---). Emissionsspektren wurden nach Anregung der Tryptophanfluoreszenz bei 295 nm in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, 60 mM EDTA, pH 8.2 bei 20°C aufgezeichnet. Die Konzentration an NHK1Gal80 und der NHK1Gal80-Varianten betrug, bis auf NHK1Gal80-W31G mit 1,5 μM, 1 μM.



Anhang A2. Plot der Endwerte der stopped-flow-Kinetiken von K1Gal80 mit NADP.

Dargestellt sind die Endwerte der relativen integralen Tryptophanfluoreszenz der NHK1Gal80-NADP-Interaktion (○) in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration. Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei 340 nm, nach Anregung bei 295 nm, direkt nach dem Mischen von 19 μM NHK1Gal80 und verschiedenen NADP-Lösungen, im Verhältnis 1+1 gemessen. Für die NHK1Gal80-NADP-Interaktion wurde ein K_D -Wert von $2,6 \times 10^{-1}$ mM bestimmt. Stopped-flow-Kinetiken wurden in 20 mM Tris, 60 mM NaCl, pH 8.2 bei 20°C aufgenommen.



Anhang A3. Wachstum der Hefekulturen für die LAC-Expression in Flüssigkultur.

Dargestellt ist die zeitabhängige Zunahme der Optischen Dichte bei 600 nm (logarithmische Skalierung) der F14 *sin4Δ ScGAL80*-Stämme in Galaktose: *ScGAL80+* (□), *Scgal80-G24V* (●), *Scgal80-W31G* (×) und *Scgal80-H99L* (△). Die Hefekulturen wurden in 0.5% Glukose-haltigem Medium vorgezogen und zur Induktion der LAC-Expression in 0.5% Galaktose-haltigem Medium umgesetzt. Die Kultivierung der Hefen erfolgte in mit allen Aminosäuren supplementiertem Minimalmedium als Schüttelkultur bei 30°C.

8. Literatur

- ¹ **Lodish, H.; Berk A.; Zipursky S. L.; Matsudaira P.; Baltimore D.; Darnell J. E.** (2001). *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer-Verlag (4. Auflage).
- ² **Griggs, D. W.; Johnston M.** (1991). Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 19; 8597–601.
- ³ **Zenke, F. T.; Zachariae W.; Lunkes A.; Breunig K. D.** (1993). Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Molecular and cellular biology*. 12; 7566–76.
- ⁴ **Melcher, K.; Xu H. E.** (2001). Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *The EMBO journal*. 4; 841–51.
- ⁵ **Zachariae, W.; Breunig K. D.** (1993). Expression of the transcriptional activator LAC9 (KIGAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Molecular and cellular biology*. 5; 3058–66.
- ⁶ **Frey, P. A.** (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 4; 461–70.
- ⁷ **Marmorstein, R.; Carey M.; Ptashne M.; Harrison S. C.** (1992). DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature*. 6368; 408–14.
- ⁸ **Gödecke, A.; Zachariae W.; Arvanitidis A.; Breunig K. D.** (1991). Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and beta-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic acids research*. 19; 5351–8.
- ⁹ **Carey, M.; Kakidani H.; Leatherwood J.; Mostashari F.; Ptashne M.** (1989). An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *Journal of molecular biology*. 3; 423–32.
- ¹⁰ **Lohr, D.; Venkov P.; Zlatanova J.** (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9; 777–87.
- ¹¹ **Riley, M. I.; Hopper J. E.; Johnston S. A.; Dickson R. C.** (1987). GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: glucose repression of the regulon. *Molecular and cellular biology*. 2; 780–6.
- ¹² **Salmeron, J. M.; Johnston S. A.** (1986). Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene LAC9 reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Nucleic acids research*. 19; 7767–81.
- ¹³ **Ma, J.; Ptashne M.** (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*. 5; 847–53.
- ¹⁴ **Rubio-Teixeira, M.** (2005). A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research*. 12; 1115–28.
- ¹⁵ **Wu, Y.; Reece R. J.; Ptashne M.** (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *The EMBO journal*. 15; 3951–63.
- ¹⁶ **Jeong, C. J.; Yang S. H.; Xie Y.; Zhang L.; Johnston S. A.; Kodadek T.** (2001). Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry*. 31; 9421–7.
- ¹⁷ **Klein, J.; Nolden M.; Sanders S. L.; Kirchner J.; Weil P. A.; Melcher K.** (2003). Use of a genetically introduced cross-linker to identify interaction sites of acidic activators within native transcription factor IID and SAGA. *The Journal of biological chemistry*. 9; 6779–86.
- ¹⁸ **Reeves, W. M.; Hahn S.** (2005). Targets of the Gal4 transcription activator in functional transcription complexes. *Molecular and cellular biology*. 20; 9092–102.
- ¹⁹ **Biddick, R.; Young E. T.** (2009). The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast (Chichester, England)*. 4; 205–20.

- ²⁰ **Kundu, S.; Horn P. J.; Peterson C. L.** (2007). SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes & development*. 8; 997–1004.
- ²¹ **Bryant, G. O.; Prabhu V.; Floer M.; Wang X.; Spagna D.; Schreiber D.; Ptashne M.** (2008). Activator control of nucleosome occupancy in activation and repression of transcription. *PLoS biology*. 12; 2928–39.
- ²² **Krebs, J. E.; Fry C. J.; Samuels M. L.; Peterson C. L.** (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell*. 5; 587–98.
- ²³ **Ma, J.; Ptashne M.** (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell*. 1; 137–42.
- ²⁴ **Johnston, S. A.; Salmeron J. M.; Dincher S. S.** (1987). Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell*. 1; 143–6.
- ²⁵ **Salmeron, J. M.; Langdon S. D.; Johnston S. A.** (1989). Interaction between transcriptional activator protein LAC9 and negative regulatory protein GAL80. *Molecular and cellular biology*. 7; 2950–6.
- ²⁶ **Dickson, R. C.; Gerardot C. J.; Martin A. K.** (1990). Genetic evidence for similar negative regulatory domains in the yeast transcription activators GAL4 and LAC9. *Nucleic acids research*. 17; 5213–7.
- ²⁷ **Zenke, F. T.; Engles R.; Vollenbroich V.; Meyer J.; Hollenberg C. P.; Breunig K. D.** (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science (New York, N.Y.)*. 5268; 1662–5.
- ²⁸ **Torchia, T. E.; Hamilton R. W.; Cano C. L.; Hopper J. E.** (1984). Disruption of regulatory gene GAL80 in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on carbon-controlled regulation of the galactose/melibiose pathway genes. *Molecular and cellular biology*. 8; 1521–7.
- ²⁹ **Zenke, F. T.; Zachariae W.; Lunkes A.; Breunig K. D.** (1993). Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Molecular and cellular biology*. 12; 7566–76.
- ³⁰ **Salmeron, J. M.; Leuther K. K.; Johnston S. A.** (1990). GAL4 mutations that separate the transcriptional activation and GAL80-interactive functions of the yeast GAL4 protein. *Genetics*. 1; 21–7.
- ³¹ **Carrozza, M. J.; John S.; Sil A. K.; Hopper J. E.; Workman J. L.** (2002). Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators. *The Journal of biological chemistry*. 27; 24648–52.
- ³² **Melcher, K.** (2005). Mutational hypersensitivity of a gene regulatory protein: *Saccharomyces cerevisiae* Gal80p. *Genetics*. 2; 469–76.
- ³³ **Anders, A.; Lilie H.; Franke K.; Kapp L.; Stelling J.; Gilles E. D.; Breunig K. D.** (2006). The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding. *The Journal of biological chemistry*. 39; 29337–48.
- ³⁴ **Bhat, P. J.; Oh D.; Hopper J. E.** (1990). Analysis of the GAL3 signal transduction pathway activating GAL4 protein-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2; 281–91.
- ³⁵ **Meyer, J.; Walker-Jonah A.; Hollenberg C. P.** (1991). Galactokinase encoded by GAL1 is a bifunctional protein required for induction of the GAL genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the gal3 phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 11; 5454–61.
- ³⁶ **Platt, A.; Ross H. C.; Hankin S.; Reece R. J.** (2000). The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 7; 3154–9.
- ³⁷ **Wolfe, K. H.; Shields D. C.** (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*. 6634; 708–13.
- ³⁸ **Yano, K.; Fukasawa T.** (1997). Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5; 1721–6.
- ³⁹ **Suzuki-Fujimoto, T.; Fukuma M.; Yano K. I.; Sakurai H.; Vonika A.; Johnston S. A.; Fukasawa T.** (1996). Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Molecular and cellular biology*. 5; 2504–8.
- ⁴⁰ **Timson, D. J.; Ross H. C.; Reece R. J.** (2002). Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *The Biochemical journal*. Pt 3; 515–20.
- ⁴¹ **Platt, A.; Reece R. J.** (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *The EMBO journal*. 14; 4086–91.

- ⁴² **Zenke, F. T.; Kapp L.; Breunig K. D.** (1999). Regulated phosphorylation of the Gal4p inhibitor Gal80p of *Kluyveromyces lactis* revealed by mutational analysis. *Biological chemistry*. 4; 419–30.
- ⁴³ **Parthun, M. R.; Jaehning J. A.** (1992). A transcriptionally active form of GAL4 is phosphorylated and associated with GAL80. *Molecular and cellular biology*. 11; 4981–7.
- ⁴⁴ **Mylin, L. M.; Bhat J. P.; Hopper J. E.** (1989). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of GAL4, a transcriptional activator. *Genes & development*. 8; 1157–65.
- ⁴⁵ **Sadowski, I.; Costa C.; Dhanawansa R.** (1996). Phosphorylation of Gal4p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription. *Molecular and cellular biology*. 9; 4879–87.
- ⁴⁶ **Rohde, J. R.; Trinh J.; Sadowski I.** (2000). Multiple signals regulate GAL transcription in yeast. *Molecular and cellular biology*. 11; 3880–6.
- ⁴⁷ **Sil, A. K.; Alam S.; Xin P.; Ma L.; Morgan M.; Lebo C. M.; Woods M. P.; Hopper J. E.** (1999). The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Molecular and cellular biology*. 11; 7828–40.
- ⁴⁸ **Peng, G.; Hopper J. E.** (2000). Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 14; 5140–8.
- ⁴⁹ **Wightman, R.; Bell R.; Reece R. J.** (2008). Localization and interaction of the proteins constituting the GAL genetic switch in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*. 12; 2061–8.
- ⁵⁰ **Peng, G.; Hopper J. E.** (2002). Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13; 8548–53.
- ⁵¹ **Ziegler, M.** (2005). A vital link between energy and signal transduction. *The FEBS journal*. 18; 4561–4.
- ⁵² **Kim, M. Y.; Mauro S.; Gévry N.; Lis J. T.; Kraus W. L.** (2004). NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 6; 803–14.
- ⁵³ **Vaziri, H.; Dessain S. K.; Ng Eaton E.; Imai S. I.; Frye R. A.; Pandita T. K.; Guarente L.; Weinberg R. A.** (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2; 149–59.
- ⁵⁴ **McLure, K. G.; Takagi M.; Kastan M. B.** (2004). NAD⁺ modulates p53 DNA binding specificity and function. *Molecular and cellular biology*. 22; 9958–67.
- ⁵⁵ **Imai, S.; Armstrong C. M.; Kaeberlein M.; Guarente L.** (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 6771; 795–800.
- ⁵⁶ **Kim, J.-H.; Cho E.-J.; Kim S.-T.; Youn H.-D.** (2005). CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain. *Nature structural & molecular biology*. 5; 423–8.
- ⁵⁷ **Rao, S. T.; Rossmann M. G.** (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of molecular biology*. 2; 241–56.
- ⁵⁸ **Rossmann, M. G.; Moras D.; Olsen K. W.** (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*. 463; 194–9.
- ⁵⁹ **Wierenga, R. K.; Terpstra P.; Hol W. G.** (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *Journal of molecular biology*. 1; 101–7.
- ⁶⁰ **Bellamacina, C. R.** (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 11; 1257–69.
- ⁶¹ **Berben, G.; Dumont J.; Gilliquet V.; Bolle P. A.; Hilger F.** (1991). The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*. 5; 475–7.
- ⁶² **Jablonowski, D.; Fichtner L.; Martin V. J.; Klassen R.; Meinhardt F.; Stark M. J.; Schaffrath R.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zymocin receptor. *Yeast (Chichester, England)*. 14; 1285–99.
- ⁶³ **Klose, C.** (2004). Struktur und Funktionsanalyse des Gal4-Inhibitors Gal80 aus *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit, Marthin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- ⁶⁴ **Breunig, K. D.; Kuger P.** (1987). Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: LAC9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site. *Molecular and cellular biology*. 12; 4400–6.
- ⁶⁵ **Zachariae, W.** (1994). Regulation des Hefetranskriptionsaktivators Lac9. PhD thesis, Düsseldorf.

- ⁶⁶ **Schöniger, T.** (2000). Konstruktion eines Selektionssystems für Deletionsmutanten in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- ⁶⁷ **Schmitz, A.; Riesner D.** (2006). Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical biochemistry*. 2; 311–3.
- ⁶⁸ **Sanger, F.; Nicklen S.; Coulson A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 12; 5463–7.
- ⁶⁹ **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 5259; 680–5.
- ⁷⁰ **Miller J.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.
- ⁷¹ **Anders, A.** (2006). Molekularer Mechanismus eines Transkriptionsschalters: Experimentelle Analyse und mathematische Modellierung des Gal4-Gal80-Gal1-Regulationsmoduls aus *Kluyveromyces lactis*. Dissertation. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- ⁷² **Eftink, M. R.; Ghiron C. A.** (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical biochemistry*. 2; 199–227.
- ⁷³ **Agashe, V. R.; Schmid F. X.; Udgaonkar J. B.** (1997). Thermodynamics of the complex protein unfolding reaction of barstar. *Biochemistry*. 40; 12288–95.
- ⁷⁴ **Lehrer, S. S.** (1971). Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*. 17; 3254–63.
- ⁷⁵ **Schmid, F. X.** (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton TE, 2nd ed. *Protein structure, a practical approach*. Oxford University Press.
- ⁷⁶ **Zhou, T.; Rosen B. P.** (1997). Tryptophan fluorescence reports nucleotide-induced conformational changes in a domain of the ArsA ATPase. *The Journal of biological chemistry*. 32; 19731–7.
- ⁷⁷ **Andrews, P. R.; Craik D. J.; Martin J. L.** (1984). Functional group contributions to drug-receptor interactions. *Journal of medicinal chemistry*. 12; 1648–57.
- ⁷⁸ **Kingston, R. L.; Scopes R. K.; Baker E. N.** (1996). The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure (London, England : 1993)*. 12; 1413–28.
- ⁷⁹ **Bottoms, C. A.; Smith P. E.; Tanner J. J.** (2002). A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 9; 2125–37.
- ⁸⁰ **Reed, J.; Reed T. A.** (1997). A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Analytical biochemistry*. 1; 36–40.
- ⁸¹ **Wallace, B. A.** (2000). Synchrotron radiation circular-dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures. *Journal of synchrotron radiation*. Pt 5; 289–95.
- ⁸² **Wallace, B. A.** (2000). Conformational changes by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Nature structural biology*. 9; 708–9.
- ⁸³ **Wallace, B. A.; Janes R. W.** (2001). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. *Current opinion in chemical biology*. 5; 567–71.
- ⁸⁴ **Cowieson, N. P.; Miles A. J.; Robin G.; Forwood J. K.; Kobe B.; Martin J. L.; Wallace B. A.** (2008). Evaluating protein:protein complex formation using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Proteins*. 4; 1142–6.
- ⁸⁵ **Balasubramanian, P.; Zhao L. J.; Chinnadurai G.** (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide stimulates oligomerization, interaction with adenovirus E1A and an intrinsic dehydrogenase activity of CtBP. *FEBS letters*. 1-3; 157–60.
- ⁸⁶ **Zheng, X.; Dai X.; Zhao Y.; Chen Q.; Lu F.; Yao D.; Yu Q.; Liu X.; Zhang C.; Gu X.; Luo M.** (2007). Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21; 8809–14.
- ⁸⁷ **Koshland, D. E.** (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2; 98–104.
- ⁸⁸ **Pilauri, V.; Bewley M.; Diep C.; Hopper J.** (2005). Gal80 dimerization and the yeast GAL gene switch. *Genetics*. 4; 1903–14.

- ⁸⁹ **Thoden, J. B.; Sellick C. A.; Reece R. J.; Holden H. M.** (2007). Understanding a transcriptional paradigm at the molecular level. The structure of yeast Gal80p. *The Journal of biological chemistry*. 3; 1534–8.
- ⁹⁰ **Kumar, P. R.; Yu Y.; Sternglanz R.; Johnston S. A.; Joshua-Tor L.** (2008). NADP regulates the yeast GAL induction system. *Science (New York, N.Y.)*. 5866; 1090–2.
- ⁹¹ **Thoden, J. B.; Ryan L. A.; Reece R. J.; Holden H. M.** (2008). The interaction between an acidic transcriptional activator and its inhibitor. The molecular basis of Gal4p recognition by Gal80p. *The Journal of biological chemistry*. 44; 30266–72.
- ⁹² **Riley, M. I.; Sreekrishna K.; Bhairi S.; Dickson R. C.** (1987). Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Molecular & general genetics : MGG*. 1-2; 145–51.
- ⁹³ **Dong, J.; Dickson R. C.** (1997). Glucose represses the lactose-galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1- dependent pathway that modulates galactokinase (GAL1) gene expression. *Nucleic acids research*. 18; 3657–64.
- ⁹⁴ **Kooistra, R.; Hooykaas P. J. J.; Steensma H. Y.** (2004). Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast (Chichester, England)*. 9; 781–92.
- ⁹⁵ **Nishizawa, M.** (2001). Negative regulation of transcription by the yeast global transcription factors, Gal11 and Sin4. *Yeast (Chichester, England)*. 12; 1099–110.
- ⁹⁶ **Schubert, K.** (2009). Einfluss des Mediator-Komplexes auf die Expression der Gene zur Laktose-Verwertung in Hefe. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- ⁹⁷ **Nehlin, J. O.; Carlberg M.; Ronne H.** (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *The EMBO journal*. 11; 3373–7.
- ⁹⁸ **Klockow, C.; Stahl F.; Scheper T.; Hitzmann B.** (2008). In vivo regulation of glucose transporter genes at glucose concentrations between 0 and 500 mg/L in a wild type of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*. 2; 161–7.
- ⁹⁹ **Bhat, P. J.; Hopper J. E.** (1992). Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast GAL/MEL regulon. *Molecular and cellular biology*. 6; 2701–7.
- ¹⁰⁰ **Torchia, T. E.; Hopper J. E.** (1986). Genetic and molecular analysis of the GAL3 gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2; 229–46.
- ¹⁰¹ **Bhat, P. J.; Hopper J. E.** (1991). The mechanism of inducer formation in gal3 mutants of the yeast galactose system is independent of normal galactose metabolism and mitochondrial respiratory function. *Genetics*. 2; 233–9.
- ¹⁰² **Bhat, P. J.; Venkatesh K. V.** (2005). Stochastic variation in the concentration of a repressor activates GAL genetic switch: implications in evolution of regulatory network. *FEBS letters*. 3; 597–603.
- ¹⁰³ **Thoden, J. B.; Sellick C. A.; Timson D. J.; Reece R. J.; Holden H. M.** (2005). Molecular structure of *Saccharomyces cerevisiae* Gal1p, a bifunctional galactokinase and transcriptional inducer. *The Journal of biological chemistry*. 44; 36905–11.
- ¹⁰⁴ **Menezes, R. A.; Amuel C.; Engels R.; Gengenbacher U.; Labahn J.; Hollenberg C. P.** (2003). Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP protein family. *Journal of molecular biology*. 3; 479–92.
- ¹⁰⁵ **Tews, A.** (2009). Untersuchungen zur Lokalisation von KGal80p in *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- ¹⁰⁶ **Meyer, J.; Walker-Jonah A.; Hollenberg C. P.** (1991). Galactokinase encoded by GAL1 is a bifunctional protein required for induction of the GAL genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the gal3 phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 11; 5454–61.
- ¹⁰⁷ **Sellick, C. A.; Jowitt T. A.; Reece R. J.** (2009). The effect of ligand binding on the galactokinase activity of yeast Gal1p and its ability to activate transcription. *The Journal of biological chemistry*. 1; 229–36.
- ¹⁰⁸ **Jacoby, J.; Hollenberg C. P.; Heinisch J. J.** (1993). Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Molecular microbiology*. 4; 867–76.
- ¹⁰⁹ **Tarrío, N.; Becerra M.; Cerdán M. E.; González Siso M. I.** (2006). Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research*. 3; 371–80.

- ¹¹⁰ **Zhao, Y.; Zhang J.; Li H.; Li Y.; Ren J.; Luo M.; Zheng X.** (2008). An NADPH sensor protein (HSCARG) down-regulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *The Journal of biological chemistry*. 16; 11004–13.
- ¹¹¹ **Zhang, Q.; Piston D. W.; Goodman R. H.** (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science (New York, N.Y.)*. 5561; 1895–7.
- ¹¹² **Fjeld, C. C.; Birdsong W. T.; Goodman R. H.** (2003). Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 16; 9202–7.
- ¹¹³ **Theobald, U.; Mailinger W.; Baltes M.; Rizzi M.; Reuss M.** (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*. 2; 305–16.
- ¹¹⁴ **Sporty, J.; Lin S.-J.; Kato M.; Ognibene T.; Stewart B.; Turteltaub K.; Bench G.** (2009). Quantitation of NAD⁺ biosynthesis from the salvage pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*. 7; 363–9.
- ¹¹⁵ **Lin, S.-J.; Ford E.; Haigis M.; Liszt G.; Guarente L.** (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & development*. 1; 12–6.
- ¹¹⁶ **Bedalov, A.; Hirao M.; Posakony J.; Nelson M.; Simon J. A.** (2003). NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 19; 7044–54.
- ¹¹⁷ **Nissen, T. L.; Anderlund M.; Nielsen J.; Villadsen J.; Kielland-Brandt M. C.** (2001). Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast (Chichester, England)*. 1; 19–32.
- ¹¹⁸ **Ditzelmüller, G.; Wöhrer W.; Kubicek C. P.; Röhr M.** (1983). Nucleotide pools of growing, synchronized and stressed cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*. 1; 63–7.
- ¹¹⁹ **Satrustegui, J.; Bautista J.; Machado A.** (1983). NADPH/NADP⁺ ratio: regulatory implications in yeast glyoxylic acid cycle. *Molecular and cellular biochemistry*. 2; 123–7.
- ¹²⁰ **Campbell, R. N.; Leverentz M. K.; Ryan L. A.; Reece R. J.** (2008). Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*. 2; 177–87.
- ¹²¹ **Sellick, C. A.; Reece R. J.** (2005). Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends in biochemical sciences*. 7; 405–12.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Karin D. Breunig danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Überlassung eines sehr interessanten und spannenden Themas. Für Ihr stetiges Interesse am voranschreiten der Arbeit und kritischen Hinweisen beim Verfassen der Arbeit bin ich dankbar.

Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. Renate Langhammer, die für Diskussionen und Überlegungen stets Zeit hatte. Desweiteren möchte ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit und ihre konstruktiven Ratschläge ganz herzlich bedanken. Ich werde die angenehme Bürozeit und die kreativen Pausen mit ihr nicht vergessen.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralph P. Golbik für die Unterstützung während der gesamten Promotion. Für die Hilfe bei der Lösung von theoretischen Problemen, das Korrekturlesen der Arbeit und die Durchführung von *stopped-flow*-Messungen möchte ich mich ganz herzlich bei ihm bedanken. Sein Mitwirken hat zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Alexander Anders danke ich für die Unterstützung während der gesamten Zeit und vielen Diskussionen.

Bei Herrn PD Dr. Hauke Lilie möchte ich mich für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Richard J. Reece (Universität von Manchester) für den Gastaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe und für die wertvollen Diskussionen bedanken.

Bei Frau Ursula Klokow möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, für viele aufmunternde Worte und die süßen Stärkungen während der gesamten Promotionszeit ganz herzlich bedanken.

Frau Karin Sorge sei an dieser Stelle ebenfalls für die gute Zusammenarbeit sowie für die Unterstützung meiner Arbeit durch die Durchführung von unzähligen β -Gal-Messungen herzlichst gedankt.

Caroline Machlitt, Melanie Wagner und Constance Zugowski danke ich für viele aufmunternde Worte und eine schöne gemeinsame Zeit.

Bei Constance Mehlgarten und René Zabel möchte ich mich für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Molekulargenetik.

Dem Institut für Biochemie und Biotechnologie danke ich für die Möglichkeit zu Messungen am Fluoreszenzspektrometer, Spektropolarimeter und VP-ITC Micro Calorimeter.

Dem Graduiertenkolleg 1026 und Frau Mechtild Wahle danke ich für eine schöne und lehrreiche Zeit.

Meiner Familie möchte ich an dieser Stelle für die vielen lieben Worte während der gesamten Zeit danken. Ein ganz großer Dank richtet sich an meine Eltern für die bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage.

Herrn Paul-Oliver Blüher danke ich für seine Liebe und den Rückhalt während der gesamten Promotionszeit. Ich danke ihm besonders für das Verständnis während der letzten Phase dieser Arbeit. Seine Unterstützung und Aufmunterungen haben entscheidend für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Curriculum vitae

Name: Schmidt
Vorname: Doreen

Geburtsdatum: 23.06.1980
Geburtsort: Wolfen
Wohnanschrift: Burgstr. 11, 06114 Halle (Saale)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Ausbildung

08/1987 - 07/1991 Grundschole in Ramsin
08/1991 - 07/1999 „Anne-Frank“ Gymnasium in Sandersdorf,
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

09/1999 - 09/2004 Studium der Biochemie am Institut für Biochemie und Biotechnologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit zum Thema „Untersuchung der molekularen Ursachen für die
ungewöhnliche Stabilität der Ribonuclease aus *Rana pipiens* (Onconase)“ in
der Abteilung Technische Enzymologie des Instituts für Biochemie und
Biotechnologie bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann,
Abschluss Diplom-Biochemikerin

01/2005 - 12/2007 Stipendiatin des DFG geförderten Graduiertenkollegs 1026 der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01/2005 - 09/2005

Teilprojekt A1 „*Structure and dynamics of protein-membrane interactions. A
case study using pyruvate oxidase from Escherichia coli*“. Institut für
Biochemie und Biotechnologie, Arbeitsgruppe Molekulare Enzymologie

10/2005 - 12/2007

Teilprojekt B2 „*Structural analysis of the Gal4-Gal80-Gal3/1 transcriptional
switch*“. Institut für Biologie, Arbeitsgruppe Molekulargenetik

01/2008 - 12/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe
Molekulargenetik

Auslandserfahrungen

06/2006 ESF-EMBO Symposium: Gene Transcription in Yeast, Sant Feliu de Guixols
(Costa Brava), Spanien

10/2006 - 12/2006 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard J. Reece an
der Universität von Manchester, UK

Halle (Saale), den 15.03.2010

Publikationen

“Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics.”

Biochemistry. 2006 Mar 21, 45 (11) :3580-7. Arnold U., Schulenburg C., Schmidt D., Ulbrich-Hofmann, R.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den 15.03.2010