

**„Untersuchungen zur Bedeutung des N-Terminus von  
KlGal80p für die Lokalisation, Interaktion und  
Regulation des Repressors in *Kluyveromyces lactis*“**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES

DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I – BIOWISSENSCHAFTEN –

DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT

HALLE-WITTENBERG,

vorgelegt

von Frau Annekathrin Reinhardt-Tews

geb. am 09. Januar 1985 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karin Breunig, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Gary Sawers, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Karsten Melcher, Van Andel Research Institute, Grand Rapids

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.11.2016

# INHALTSVERZEICHNIS

---

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Unterschiede in der Lebensweise von <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i> . . . . .	1
1.2 Der Regulationsmechanismus des GAL-Regulons . . . . .	2
1.3 Die regulatorischen Proteine . . . . .	4
1.3.1 Der Transkriptionsaktivator - Gal4p . . . . .	4
1.3.2 Der Repressor - Gal80p . . . . .	5
1.3.3 Der Galactosesensor - Gal1p/Gal3p . . . . .	9
1.4 Modelle zur Interaktion der GAL-Regulatoren . . . . .	12
1.4.1 Das Allosterische Modell . . . . .	12
1.4.2 Das Dissoziationsmodell . . . . .	13
1.5 Interaktionen des Repressors Gal80p . . . . .	16
1.5.1 Gal4p-Gal80p-Interaktion . . . . .	16
1.5.2 ScGal80p-ScGal3p-Interaktion . . . . .	17
1.5.3 KlGal80p-KlGal1p-Interaktion . . . . .	19
1.6 Zielstellung dieser Arbeit . . . . .	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Materialien . . . . .	22
2.1.1 Chemikalien . . . . .	22
2.1.2 Stämme . . . . .	24
2.1.2.1 <i>Kluyveromyces lactis</i> . . . . .	24
2.1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	25
2.1.2.3 <i>Escherichia coli</i> . . . . .	26
2.1.3 Konstruktion von Hefestämmen durch <i>gene replacement</i> . . . . .	26
2.1.4 Medien und Anzucht . . . . .	29
2.1.4.1 Hefe . . . . .	29

2.1.4.2	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	29
2.1.5	Plasmide . . . . .	30
2.1.6	Oligonukleotide . . . . .	37
2.1.7	Lyophilisiertes <i>KlGal4p</i> -AD22-Peptid . . . . .	40
2.1.8	Enzyme, Standards und Antikörper . . . . .	41
2.1.8.1	Enzyme . . . . .	41
2.1.8.2	Standards . . . . .	41
2.1.8.3	Antikörper . . . . .	42
2.1.9	Zentrifugen . . . . .	42
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	42
2.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	42
2.2.1.1	DH5 $\alpha$ . . . . .	42
2.2.1.2	TOP10 . . . . .	43
2.2.2	Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA . . . . .	44
2.2.2.1	Herstellung kompetenter Hefezellen . . . . .	44
2.2.3	Bestimmung der Optischen Dichte . . . . .	44
2.2.4	Isolation von Nukleinsäuren . . . . .	44
2.2.4.1	Isolation chromosomaler DNA aus Hefe . . . . .	44
2.2.4.2	Schnellisolation chromosomaler DNA aus Hefezellen für Kolonie-PCR . . . . .	45
2.2.4.3	Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> . . . . .	45
2.2.4.4	Isolation von Plasmiden aus Hefe . . . . .	45
2.2.4.5	Isolation von RNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	45
2.2.5	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration . . . . .	46
2.2.6	Amplifikation von DNA . . . . .	46
2.2.7	DNA-Restriktion . . . . .	47
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	47
2.2.9	DNA-Elution aus dem Gel . . . . .	48
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	48
2.2.11	Reinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	48
2.2.12	Ortsgerichtete Mutagenese . . . . .	48
2.2.13	<i>Random</i> -Mutagenese . . . . .	48
2.2.14	InFusion Klonierung . . . . .	49
2.2.15	DNA-Sequenzierung . . . . .	49

2.2.16	DNA-Fällung . . . . .	49
2.2.17	X-Gal-Plattentest . . . . .	50
2.2.18	Wachstumskurve . . . . .	50
2.2.19	Southern-Blot . . . . .	50
2.2.20	Mikroskopie . . . . .	52
2.2.20.1	Immunfluoreszenz . . . . .	52
2.2.20.2	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	52
2.3	Biochemische Methoden . . . . .	52
2.3.1	Herstellung von Proteinzell-extrakten für Western-Blot-Analysen	52
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	53
2.3.2.1	Bradford-Test . . . . .	53
2.3.2.2	Spektroskopische Proteinkonzentrationsbestimmung	53
2.3.3	Auftrennung von Proteinen . . . . .	54
2.3.4	Coomassie-Färbung . . . . .	54
2.3.5	Ponceau S Färbung . . . . .	54
2.3.6	Western-Blot-Analyse . . . . .	54
2.3.7	Proteinaufreinigung . . . . .	55
2.3.8	Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen . . . .	56
2.3.9	$\beta$ -Galactosidase-Assay . . . . .	57
2.3.10	Galactokinase-Inhibierungsassay . . . . .	58
2.4	Biophysikalische Methoden . . . . .	61
2.4.1	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	61
2.4.2	Nah-UV-VIS-CD-Spektroskopie . . . . .	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Analysen zu Kernlokalisations-signalen in <i>Sc</i> - und <i>KlGal80p</i> . . . . .	63
3.2	Untersuchung des Einflusses der Lokalisation von <i>KlGal80p</i> auf die Reprimier- und Induzierbarkeit des <i>GAL/LAC</i> -Schalters . . . . .	69
3.2.1	Phänotypische Untersuchung des <i>KlGal80</i> -Mutantenstammes JA6/G80-KR56A . . . . .	69
3.2.1.1	Modelle zur Erklärung der verschiedenen Phänotypen von JA6/G80-KR56A . . . . .	75
3.2.2	Untersuchung des Einflusses der gestörten Kernlokalisierung von <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A auf die Lokalisation von <i>KlGal1p</i> . . .	75

3.2.3	Phänotypische Untersuchung einer durch SV40-NLS-Fusion kernlokalisierten <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A-Variante . . . . .	79
3.2.4	Abhängigkeit der <i>KlGal1p</i> -Lokalisation von <i>KlGal80p</i> . . . . .	83
3.2.5	Untersuchung auf Dominanz und Supprimierbarkeit des superreprimierten Phänotyps der JA6/G80-KR56A-Mutante . . . . .	84
3.2.6	Bestimmung der Affinität von <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A für <i>KlGal1p</i> . . . . .	87
3.2.7	Untersuchung des Einflusses der Aminosäureaustausche K5A und R6A in <i>ScGal80p</i> auf die Induktion und Repression . . . . .	89
3.3	Analyse der in der NADP-Bindung beeinflussten <i>KlGal80p</i> -Mutanten . . . . .	91
3.3.1	Konstruktion weiterer in der NADP-Bindung gestörter <i>KlGal80p</i> -Varianten . . . . .	92
3.3.2	Phänotypische Untersuchung der in der NADP-Bindung beeinflussten <i>KlGal80p</i> -Varianten . . . . .	95
3.3.3	Einfluss der Aminosäureaustausche in der NADP- Bindedomäne auf die Interaktion mit <i>KlGal1p</i> und <i>KlGal4p</i> -AD22-Peptid . . . . .	98
3.3.4	Einfluss des N-terminalen K5A/R6A-Austauschs in <i>KlGal80p</i> auf die NADP-Bindung . . . . .	100
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>103</b>
4.1	Identifizierung der N-terminalen Kernlokalisationssequenz in <i>KlGal80p</i> . . . . .	103
4.2	Der Einfluss der Lokalisation von Gal80p auf die Regulation des <i>GAL</i> -Schalters . . . . .	106
4.2.1	Das Shutteln von <i>ScGal80p</i> ist nicht Induktionsprinzip in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	106
4.2.2	Die in der Kernlokalisation gestörte <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A- Variante führt zu einem superreprimierten Phänotyp . . . . .	107
4.2.3	Die gestörte Kernlokalisation von <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A ist nicht ursächlich für den superreprimierten Phänotyp in JA6/G80-KR56A . . . . .	107
4.3	Die Lokalisation von <i>KlGal1p</i> wird durch die <i>KlGal80p</i> -Lokalisation sowie -Interaktion beeinflusst . . . . .	109
4.3.1	Co-Transport funktionell verknüpfter Proteine . . . . .	110

4.4	Untersuchungen zur Interaktion des Repressors Gal80p mit den induzierenden Proteinen <i>KlGal1p</i> und <i>ScGal3p</i> . . . . .	112
4.4.1	<i>KlGal80p</i> -K5A/R6A ist in der N-terminalen Interaktion mit <i>KlGal1p</i> gestört . . . . .	112
4.4.2	Die Rolle des N-Terminus von Gal80p im Zusammenhang mit der Gal1p/Gal3p-Interaktion . . . . .	112
4.4.3	Unterschiede zwischen <i>ScGal80p</i> und <i>KlGal80p</i> in den N-terminalen Interaktionsstellen mit dem induzierenden Protein . . . . .	114
4.4.4	Konservierung der <i>ScGal80p</i> / <i>KlGal80p</i> -Interaktionsstellen in <i>ScGal3p</i> und <i>KlGal1p</i> . . . . .	115
4.4.5	Modell zur Interaktion von <i>KlGal80p</i> und <i>KlGal1p</i> . . . . .	117
4.4.5.1	Erklärung des superreprimierten Phänotyps von JA6/G80-KR56A . . . . .	117
4.4.5.2	Suppression des superreprimierten Phänotyps . . . . .	120
4.4.5.3	Übertragung des Interaktionsmodells auf <i>ScGal80p</i> . . . . .	124
4.4.5.4	Zusammenhang zwischen N-terminaler NLS und Inhibierung der Galactokinasefunktion . . . . .	125
4.5	Untersuchung des Einflusses von NAD(P) auf die Regulation der <i>GAL</i> -Gene . . . . .	126
4.5.1	Die Mutation der NADP-Bindestelle in Gal80p zeigt pleiotrope Effekte auf den <i>GAL</i> -Regulationsschalter . . . . .	127
4.5.2	Intrazelluläre Konzentration von NAD(P)/H in <i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i> . . . . .	128
4.5.3	Der Einfluss des Stoffwechsels und seiner Intermediate auf die Gentranskription in verschiedenen Spezies . . . . .	130
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>132</b>
	<b>Literatur</b>	<b>134</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

1.1	Leloir-Stoffwechsel . . . . .	3
1.2	<i>ScGAL80</i> -Karte . . . . .	18
3.1	Untersuchung der Lokalisation von <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A durch Immunfluoreszenzmikroskopie. . . . .	64
3.2	Schematische Übersicht über die GFP-Fusionsproteine. . . . .	65
3.3	Der Einfluss des N-Terminus von <i>KlGal80p</i> auf die Lokalisation. . . . .	66
3.4	Untersuchung der für den Lokalisationsunterschied von <i>KlGal80p</i> und <i>ScGal80p</i> verantwortlichen Domäne. . . . .	68
3.5	Wachstum der JA6/G80-KR56A-Mutante nach Galactose-Shift . . . . .	70
3.6	Untersuchung der Induzier- und Reprimierbarkeit des Mutantenstamms JA6/G80-KR56A. . . . .	71
3.7	Einfluss der deregulierten Expression des <i>KlGal80p</i> -Varianten auf die <i>LAC</i> -Genexpression. . . . .	72
3.8	Untersuchung der <i>LAC</i> -Genexpression im Stamm JA6/G80-KR56A nach mehrtägigem Wachstum in galactosehaltigem Medium. . . . .	74
3.9	Einfluss der Lokalisation von <i>KlGal80p</i> auf die <i>KlGal1p</i> -Lokalisation. . . . .	76
3.10	Untersuchung des Einflusses der Kernlokalisierung von SV40-NLS- <i>KlGal1p</i> auf die <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A-Lokalisation. . . . .	78
3.11	Einfluss der Lokalisation von <i>KlGal1p</i> auf die Induktion der <i>LAC</i> -Gene im Wildtyp- und K5A R6A-Mutantenstamm. . . . .	79
3.12	Untersuchung des Einflusses einer SV40-NLS-Fusion an die <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A-Variante durch Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	80
3.13	Einfluss der <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A-Lokalisation auf die Repression im X-Gal-Plattentest. . . . .	81
3.14	Induktion von JA6/G80-SVKR im $\beta$ -Galactosidase-Assay. . . . .	82
3.15	Untersuchung der Abhängigkeit der <i>KlGal1p</i> -Lokalisation von der <i>KlGal80p</i> -Lokalisation sowie der <i>KlGal1p</i> - <i>KlGal80p</i> -Interaktion. . . . .	84
3.16	Suppression des Mutantenphänotyps . . . . .	86
3.17	Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante über den Galactokinaseinhibierungsassay für <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A . . . . .	89

---

3.18	Sequenzalignment verschiedener <i>GAL80</i> -Homologe . . . . .	90
3.19	Untersuchung der <i>LAC</i> -Genexpression im <i>Scgal80-K5A/R6A</i> exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> -Stamm FI4 sin4 . . . . .	91
3.20	Sequenz des <i>Domain-Swap</i> -Austauschs . . . . .	93
3.21	Messung der NADP-Bindung durch Nah-UV/VIS-CD-Spektroskopie	94
3.22	Untersuchung der Repressionsfähigkeit verschiedener in der NADP-Bindung variabler <i>KlGal80p</i> -Varianten im X-Gal-Plattentest . . . . .	96
3.23	Bestimmung der Induktionsfähigkeit der <i>KlGal80p</i> -NADP-Bindemutanten im $\beta$ -Galactosidase-Assay. . . . .	97
3.24	Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante über den Galactokinaseinhibierungsassay für <i>NHklGal80p-W31F</i> . . . . .	99
3.25	Untersuchung der NADP-Affinität von <i>KlGal80p-K5A/R6A</i> . . . . .	101
3.26	Messung der <i>KlGal80p</i> -bedingten Reduktion der Galactokinaseaktivität von <i>KlGal1p</i> in An- und Abwesenheit des <i>KlGal4p-AD22</i> -Peptids und NADP. . . . .	102
4.1	Kristallstrukturen von <i>ScGal80p</i> und <i>KlGal80p</i> . . . . .	113
4.2	Strukturmodelle zur Interaktion von <i>Sc/KlGal80p</i> mit <i>ScGal3p/KlGal1p</i> .116	
4.3	Modell zur Bedeutung des <i>KlGal80p</i> -N-Terminus für die <i>KlGal4p</i> -Aktivierung. . . . .	119

# TABELLENVERZEICHNIS

---

2.2	<i>Kluyveromyces lactis</i> Stämme . . . . .	24
2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme . . . . .	25
2.4	<i>Escherichia coli</i> Stämme . . . . .	26
2.5	Gene replacement in <i>K. lactis</i> . . . . .	27
2.6	Primer für gene replacement in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	28
2.7	Verwendete Plasmide . . . . .	30
2.8	Innerhalb dieser Arbeit konstruierte Plasmide . . . . .	32
2.9	Oligonukleotide . . . . .	37
2.10	Antikörper . . . . .	42
2.11	Polymerase-Kettenreaktion mittels <i>Taq</i> - und <i>Pfu</i> -Polymerase . . . . .	47
2.12	Polymerase-Kettenreaktion mittels Phusion-Polymerase . . . . .	47
3.1	Messung der <i>KlGal80p</i> -bedingten Reduktion der Galactokinaseaktivität von <i>KlGal1p</i> . . . . .	88
3.2	Inhibierung der Galaktokinasefunktion von <i>KlGal1p</i> durch <i>KlGal80p</i> -W31F und -SW . . . . .	98
4.1	<i>KlGal1p</i> -Suppressorvarianten. . . . .	122

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
C-Terminus	Carboxy-Terminus des Proteins
Da	Dalton
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
g	Normfallbeschleunigung
Gal	Galactose
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glc	Glucose
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
(His) <sub>6</sub> -tag	sechsfache Histidin-Markierung
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>

---

LB <sup>amp</sup>	mit Ampicillin versetztes LB-Medium
Lf	Lidfaktor
mc	<i>multi copy</i> : Es liegen mehrere Kopien des Gens vor.
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
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
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus des Proteins
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
sc	<i>single copy</i> : Es liegt eine Kopie des Gens vor.
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
SSC	Natriumchlorid–Natriumcitrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	<i>Tris-Buffered Saline</i> + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
URS	<i>upstream repressing requence</i>
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultraviolett
UV-VIS	ultraviolett sichtbar
Vf	Verdünnungsfaktor
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -DL-galactopyranosid
YEP	<i>Yeast Extract Peptone</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

# 1 EINLEITUNG

---

„Es ist nicht die stärkste Spezies, die überlebt, auch nicht die intelligenteste, es ist diejenige, die sich am ehesten dem Wandel anpassen kann.“

Charles Darwin

Anpassung, ein Merkmal des Lebens, ist für einen Organismus essentiell, um sein Überleben zu sichern. Die Anpassung des Stoffwechsels an sich ändernde Umweltbedingungen zur Nutzung der jeweils vorhandenen Nahrungsquellen ist hierbei von besonderer Bedeutung und selbst für einen einfachen, einzelligen Eukaryot wie Hefe möglich. Hefe, ein Modellorganismus für viele molekularbiologische Untersuchungen, ist in der Lage, die Expression jener Enzyme, welche für die Verwertung bestimmter Kohlenstoffquellen benötigt werden, gezielt zu regulieren. *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* sind im Hinblick hierauf besonders gut untersucht. Sie können gezielt zwischen der Nutzung von Glucose, Galactose und weiterer Kohlenstoffquellen wechseln.

## 1.1 Unterschiede in der Lebensweise von *S. cerevisiae* und *K. lactis*

Während *Saccharomyces cerevisiae* zu den fakultativ anaeroben Hefen zählt (Visser *et al.*, 1990), kann *Kluyveromyces lactis* unter strikt anaeroben Bedingungen nicht wachsen (Snoek und Steensma, 2006). Zudem nutzen beide Hefen Fermentation und Atmung in ganz unterschiedlichem Maße zur Energiegewinnung. In *S. cerevisiae* macht Atmung nur 10 % der Energiegewinnung unter aeroben Bedingungen aus, wohingegen in *K. lactis* die Atmung gegenüber der Gärung überwiegt (González Siso *et al.*, 1996b). *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, Glucose zu fermentieren und zwar auch in Anwesenheit von Sauerstoff (Crabtree-positive Hefe). *K. lactis* hingegen ist Crabtree-negativ und zudem Kluyver-Effekt-positiv in Bezug auf Galactose. Diesen im Prinzip fermentierbaren Zucker kann *K. lactis* nur durch Atmung verstoffwechseln. Zudem ist die Repression durch Glucose in *Saccharomyces cerevisiae* deutlich sensitiver und stärker ausgeprägt. Die schwächere Glucoserepression in

*Kluyveromyces lactis* kann womöglich auf die Verwertung von Lactose zurückgeführt werden. Durch die Spaltung der Lactose in Glucose und Galactose müssen beide Zucker oft parallel verwertet werden. Da *S. cerevisiae* keine Lactose verwerten kann, spielt dies hier keine Rolle.

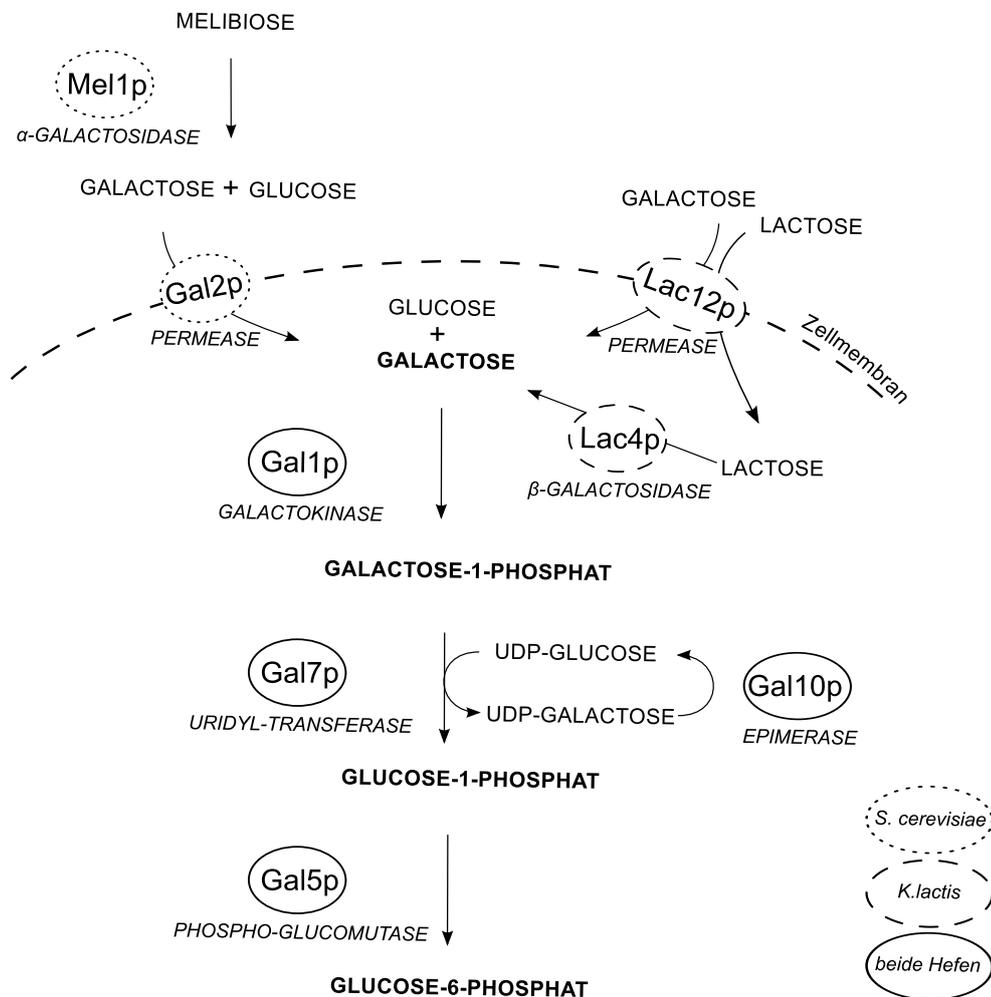
## 1.2 Der Regulationsmechanismus des GAL-Regulons

Zur Nutzung von Galactose benötigt Hefe die Enzyme des Leloir-Stoffwechsels (Caputto *et al.*, 1949; Leloir, 1951; Cardini und Leloir, 1953; Frey, 1996; Abbildung 1.1), welche dazu dienen Galactose in Glucose-6-Phosphat umzuwandeln. Glucose-6-Phosphat wird daraufhin in der Glycolyse weiter verstoffwechselt.

Die Leloir-Enzyme werden durch die sogenannten GAL-Gene kodiert, deren Expression wiederum durch den GAL-Regulationsschalter gesteuert wird. In *S. cerevisiae* wird Galactose als extrazelluläres Spaltprodukt der  $\alpha$ -Galactosidase (*MEL1*) durch die Galactosepermease (*GAL2*) in die Zelle transportiert. In *K. lactis* wird zunächst Lactose durch die Lactose/Galactose-Permease (*LAC12*) in die Zelle transportiert und anschließend intrazellulär durch die  $\beta$ -Galactosidase (*LAC4*) in Glucose und Galactose gespalten. Galactose wird in beiden Hefen durch die Leloir-Enzyme Galactokinase (*GAL1*), Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (*GAL7*) und Uridin-Diphosphoglucose-4-Epimerase (*GAL10*) sowie die Phosphoglucomutase (*GAL5*) zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt (Review: Rubio-Teixeira, 2005).

Das GAL-Regulon ist ein Modell für die eukaryotische Genregulation. Dieser Schalter basiert auf drei Proteinen: Aktivator, Repressor und Galactosesensor. Die Aktivierung der Expression der GAL-Gene erfolgt durch die Bindung des Transkriptionsaktivators Gal4p an eine 17 bp lange UAS (*Upstream Activating Sequences*) (Bram und Kornberg, 1985; Giniger *et al.*, 1985). Diese liegt im *Upstream*-Promotorbereich der GAL-Gene (Ma und Ptashne, 1987a, Keegan *et al.*, 1986). Die Gal4p-Bindung sorgt für die Assemblierung von SAGA-Komplex, Mediator und Transkriptionsinitiationskomplex am Promotor (Review: Traven *et al.*, 2006) der Gene, welche für die Verwertung von Melibiose und Galactose (*MEL/GAL*-Gene) in *S. cerevisiae* und Galactose und Lactose (*GAL/LAC*-Gene) in *K. lactis* benötigt werden. In Abwesenheit dieser Kohlenstoffquellen wird Gal4p durch Gal80p gebunden. Hierdurch wird die Aktivierung der Transkription verhindert. Ist Galactose verfügbar, so kann der Ga-

lactosesensor (*KlGal1p* in *K. lactis* beziehungsweise *ScGal3p* in *S. cerevisiae*) mit dem jeweiligen Gal80p interagieren und so den reprimierenden Effekt von Gal80p auf Gal4p aufheben. Dies ermöglicht schließlich die Transkription.



**Abbildung 1.1** Stoffwechselweg von Galactose in *S. cerevisiae* und *K. lactis*. Schematische Darstellung der Aufnahme und Umwandlung von Galactose. Die Enzyme des Leloir-Stoffwechsels (Gal1p, Gal7p, Gal10p) sind in beiden Hefen konserviert.

Der *GAL*-Schalter kennt drei Zustände: Unter induzierenden Bedingungen ist Galactose im Medium und die *GAL*-Gene werden exprimiert. In Glucose-haltigem Medium wird die Expression der *GAL*-Gene unterdrückt (reprimierende Bedingungen). In Kohlenstoffquellen wie Raffinose oder Glycerol (nicht-reprimierende, nicht-induzierende Bedingungen) wird die Expression der *GAL*-Gene weder induziert noch reprimiert. Es erfolgt lediglich eine Basalexpression.

### 1.3 Die regulatorischen Proteine und ihre strukturellen und funktionellen Unterschiede in *S. cerevisiae* und *K. lactis*

Die Entwicklungslinien von *S. cerevisiae* und *K. lactis* zweigten vor über einhundert Millionen Jahren von einander ab (Hagman *et al.*, 2014). Trotz Ähnlichkeiten im grundlegenden Prinzip des Regulationsschalters gibt es zwischen beiden Hefen doch zahlreiche Unterschiede wie Regulation, Lokalisation und Interaktion zwischen den Regulatoren. Im Folgenden sollen die drei regulatorischen Proteine vorgestellt und auf Besonderheiten und Unterschiede der Homologe in *S. cerevisiae* und *K. lactis* eingegangen werden.

#### 1.3.1 Der Transkriptionsaktivator - Gal4p

##### Funktion und Struktur

Gal4p ist der Prototyp eines Transkriptionsaktivators. Es zählt zur Gruppe der Zink-Cluster-Proteine ( $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ ) unter den Transkriptionsregulatoren. Zink-Cluster-Proteine zeichnen sich durch ein konserviertes Motiv aus sechs Cysteinen (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>6</sub>-Cys-X<sub>5-12</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>6-8</sub>-Cys), welche zwei Zink-Ionen binden, aus. Diese Konsensussequenz bildet die Interaktionsstelle mit der DNA. Das Zink-Cluster-Motiv konnte bisher ausschließlich in anderen Pilzen (*K. lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*), nicht jedoch in Prokaryoten und höheren Eukaryoten gefunden werden. Dabei sind sie besonders häufig unter den Ascomyceten zu finden (MacPherson *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* gibt es 46 Zink-Cluster-Proteine (Campbell *et al.*, 2008).

Zink-Cluster-Proteine binden an Nukleotid-Triplets (häufig 5'-CGG-3'), welche einfach oder doppelt auftreten. Die Orientierung (direkte, invertierte oder evertierte Wiederholung) und der Abstand der Triplets bestimmen die Bindespezifität an die DNA. Gal4p bindet als Homodimer an die UAS (*upstream activating sequence*) 5'-CGGN<sub>11</sub>CCG-3'. Die DNA-Bindedomäne, bestehend aus Zinkfinger-, Linker- und Dimerisierungsdomäne, befindet sich am N-Terminus von Gal4p (Keegan *et al.*, 1986; Johnston, 1987; Carey *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 2008). C-terminal liegt die Transkriptionsaktivierungsdomäne sowie die Gal80p-Interaktionsstelle (Ma und Ptashne, 1987b; Ma und Ptashne, 1987c).

## Regulation

Während *ScGAL4* konstitutiv exprimiert wird, wird *KlGAL4* autoregulatorisch reguliert (Zachariae und Breunig, 1993; Czyz *et al.*, 1993). Die Autoregulation von *KlGAL4* führt zu einem höheren Basallevel der durch *KlGal4p* aktivierten *GAL*-Gene in *K. lactis* und zu einem Anstieg der *KlGal4p*-Konzentration im Zuge der Induktion. Ohne Erhöhung des *KlGal4p*-Levels wäre eine partielle Induktion zwar noch möglich, das Wachstum auf Galactose jedoch gestört (Zachariae und Breunig, 1993). Des Weiteren ist die Expression von *KlGAL4* durch die Autoregulation auch von der Repression betroffen. *KlGal80p* reprimiert die Expression von *KlGAL4*, indem es das am *KlGAL4*-Promotor gebundene *KlGal4p* bindet. In *S. cerevisiae* führt hingegen die Bindung von Mig1p (Griggs und Johnston, 1991; Nehlin *et al.*, 1991) an die *upstream* des *ScGAL4* Promotors gelegene URS (*upstream repressing sequence*) zu einer deutlich stärkeren Repression der *GAL*-Gene, als es in *K. lactis*, wo *KlGAL4* keine Mig1p-Bindestelle besitzt, der Fall ist.

Die Regulation von Gal4p ist in *K. lactis* daher stärker von dem induzierenden Effekt durch die Anwesenheit von Galactose, in *S. cerevisiae* hingegen vom reprimierenden Effekt durch Glucose gesteuert (Zachariae und Breunig, 1993).

## Austauschbarkeit

Trotz der geringen Sequenzübereinstimmung (28 % Übereinstimmung und 57 % Ähnlichkeit der Proteine) können die beiden *GAL4*-Homologe aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* eine *gal4*-Deletion im jeweils anderen Organismus komplementieren (Salmeron und Johnston, 1986; Riley *et al.*, 1987).

### 1.3.2 Der Repressor - Gal80p

#### Funktion und Struktur

Gal80p ist der Repressor des *GAL*-Schalters. Es bindet Gal4p und verhindert so die Assemblierung des Präinitiationskomplexes und damit die Genexpression. Im N-Terminus beider Gal80p-Homologe befindet sich ein Dinukleotidbindemotiv: die Rossmann-Falte. Das Motiv besteht aus sechs  $\beta$ -Faltblättern, welche durch Alpha-Helices verbunden sind. Im C-Terminus von Gal80p liegt die Dimerisierungsdomäne

ne, welche aus einer großen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besteht. In der sogenannten Linker-Region (Aminosäuren 325 bis 365 von *KlGAL80* und 324 bis 349 von *ScGAL80*) gibt es so gut wie keine Sequenzübereinstimmung zwischen beiden homologen Proteinen (Zenke *et al.*, 1993). Innerhalb der Linker-Region haben große Insertionen (an Position 341) und auch Deletionen (Aminosäure 322 bis 340) keinen Einfluss auf die Repressorfunktion (Zenke *et al.*, 1993). Für das sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisierte *ScGal80p* sind zudem zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) beschrieben: NLSI (Aminosäure 1 bis 109) und NLSII (Aminosäure 342 bis 405) (Nogi und Fukasawa, 1989). Die Daten von Peng und Hopper (2000) zeigen, dass *ScGal80p* auch aus dem Kern heraus transportiert wird, was auf die Existenz einer NES (*nuklear export signal*) hindeutet. Für das kernlokalisierte *KlGal80p* ist bisher keine NLS beschrieben. Die Daten meiner Diplomarbeit (Tews, 2009) deuten auf eine N-terminale NLS in *KlGal80p* hin.

Für *ScGal80p* existieren bereits mehrere Kristallstrukturen auch zusammen mit dem Liganden NAD und der Aktivierungsdomäne von *ScGal4p* (Kumar *et al.*, 2008). Des Weiteren liegt eine Co-Kristallstruktur von *ScGal80p* im Komplex mit *ScGal3p* vor (Lavy *et al.*, 2012). Es existieren bisher zwei Kristallstrukturen von *KlGal80p*. Eine von *KlGal80p* allein (Thoden *et al.*, 2007) und eine im Komplex mit der Aktivierungsdomäne von *KlGal4p* (Thoden *et al.*, 2008). Beide Homologe wurden als Dimere kristallisiert (Thoden *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Die Aufklärung der Kristallstruktur lieferte Aufschluss darüber, wie die Bindung der Interaktionspartner erfolgt (siehe Kapitel 1.5).

## Regulation

*GAL80* wird in beiden Hefen autoregulatorisch exprimiert. Da die Expression von *GAL80* durch Gal4p aktiviert wird, wird sie demzufolge durch das eigene Genprodukt Gal80p reprimiert. Dadurch wird unter induzierenden Bedingungen der Repressor Gal80p stärker exprimiert als unter reprimierenden. Im Promotor von *ScGAL80* befindet sich eine UAS Bindestelle. *ScGAL80* wird unter induzierenden Bedingungen um den Faktor 5 stärker exprimiert (Igarashi *et al.*, 1987). Dagegen befinden sich im *KlGAL80* Promotor zwei UAS Bindestellen, so dass *KlGAL80* unter induzierenden Bedingungen 70-fach stärker exprimiert wird (Zenke *et al.*, 1993). In *K. lactis* ist zudem die Glucoserepression deutlich schwächer als in *S. cerevisiae*. In

einer *Scgal80*-Mutante liegt die Enzymaktivität der *GAL*-Gene nur bei 5 % gegenüber dem induzierten Zustand (Nehlin *et al.*, 1991). In einer *KlGal80*-Mutante liegt die Aktivität bei 35 % (Zenke *et al.*, 1993). Die Glucoserepression ist hier stärker von *KlGal80p* abhängig. Obwohl in *K. lactis* das Basallevel der Regulatoren höher ist, dauert es dennoch länger bis das Maximum erreicht ist. Dies liegt an der steigenden Konzentration von *KlGal80p* (Pannala *et al.*, 2011).

### Austauschbarkeit

Die beiden Gal80p-Homologen aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit (75 %) und Sequenzübereinstimmung (58 %) auf (EMBOSS Matcher, Rice *et al.*, 2000) und sind untereinander austauschbar. *ScGAL80* kann eine *KlGal80*-Deletion (Zenke *et al.*, 1993; Zenke *et al.*, 1999) und *KlGAL80* eine *Scgal80*-Deletion (Zenke *et al.*, 1999) komplementieren.

### Phosphorylierung

Ein weiterer Unterschied zwischen *ScGal80p* und *KlGal80p* liegt in der Phosphorylierung. Während für *ScGal80p* keine Phosphorylierung bekannt ist, zeigt *KlGal80p* eine phosphorylierte sowie dephosphorylierte Form in verschiedenen Kohlenstoffquellen (Zenke *et al.*, 1999). Unter induzierenden Bedingungen überwiegt die dephosphorylierte, in Glycerol und Glucose die phosphorylierte Form. Es ist nicht klar, ob es im Zuge der Induktion zu einer Dephosphorylierung kommt oder ob die phosphorylierte Form lediglich durch einen Verdünnungseffekt und die fehlende Phosphorylierung des neu exprimierten *KlGal80p* abnimmt. *KlGal80p* wurde auch in *S. cerevisiae* phosphoryliert nachgewiesen (Zenke *et al.*, 1999). Demnach ist die Phosphorylierung nicht speziesabhängig.

*KlGal1p* beeinflusst den Phosphorylierungszustand negativ. In einer *KlGal1* Deletionsmutante kommt es nicht zu einer Dephosphorylierung unter induzierenden Bedingungen (Zenke *et al.*, 1999). Jedoch ist die Bindung von *KlGal80p* an *KlGal1p* oder *KlGal4p* für die Phosphorylierung nicht nötig, da auch die *KlGal4p* bindungsdefiziente Variante *KlGal80-31p* sowie die *KlGal1p* bindungsdefiziente Variante *KlGal80p-S2* reguliert phosphoryliert werden.

Es konnte kein Unterschied in der Affinität der phosphorylierten oder dephosphorylierten Form von *KlGal80p* für die Interaktion mit der *KlGal4p*-Aktivierungsdomäne

oder *KlGal1p* im Pulldown-Assay festgestellt werden. Interessanterweise überwiegt jedoch in der konstitutiv induzierten Variante *KlGal80p-S0*, welche *in vitro* noch an *KlGal4p*-AD bindet, die dephosphorylierte Form (Zenke *et al.*, 1999). Daher wird diskutiert, inwieweit die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Induktion ausübt.

### Lokalisation

*KlGal80p* ist ausschließlich im Kern (Anders *et al.*, 2006) zu finden. Dahingegen ist *ScGal80p* sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Die Lokalisation ist protein- und nicht wirtsabhängig, da beide Gal80p Proteine auch in der jeweils anderen Hefe kern- (*KlGal80p*) beziehungsweise in der gesamten Zelle (*ScGal80p*) lokalisiert sind (Anders *et al.*, 2006). Es wurde kontrovers diskutiert, inwieweit das Shutteln von *ScGal80p* ein Prinzip des Induktionsprozesses ist (Siehe Kapitel 1.4).

### Ligandenbindung

Gal80p weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Mitgliedern der GFOR-Proteinfamilie (Glucose-Fructose-Oxidoreduktasen) auf (Kingston *et al.*, 1996; Aravind und Koonin, 1998; Thoden *et al.*, 2007). Diese sind in der Lage NAD(P) zu binden. Auch für Gal80p konnte die Fähigkeit zur NAD(P)-Bindung nachgewiesen werden (Kumar *et al.*, 2008; Schmidt, 2010; Li *et al.*, 2010a; Blüher *et al.*, 2014). Dies wird durch die N-terminale Rossmann-Domäne (Rossmann *et al.*, 1974) ermöglicht. Die Bindemotive GFVGLNAA in *ScGal80p* und GFVGLTSG in *KlGal80p* unterscheiden sich jedoch geringfügig vom klassischen Motiv GXGXX(G/A) (Wierenga *et al.*, 1986) und umfassen die Aminosäuren 21 bis 28. Während *ScGal80p* zusammen mit NAD kristallisiert wurde (Kumar *et al.*, 2008), konnte für *KlGal80p* kein gebundenes Dinukleotid in der Kristallstruktur gezeigt werden (Thoden *et al.*, 2008). Strukturell konnten zwischen den Kristallstrukturen von *ScGal80p* mit gebundenem NAD und *KlGal80p* (Kumar *et al.*, 2008) ohne Dinukleotid (Thoden *et al.*, 2007) keine großen Unterschiede beobachtet werden. Kumar *et al.* (2008) postulieren, dass NAD möglicherweise die Bindung zwischen *ScGal80p* und *ScGal4p* begünstigt, da diese zusammen kristallisiert wurden, und dass NADP diese Interaktion stört. Sie vermuten ebenso, dass die Bindung von NAD und NADP durch *ScGal80p* und der Einfluss dieser Ligandenbindung auf die *ScGal80p-ScGal4p*-Interaktion einen Weg zur Messung des metabolischen Zustandes der Zelle darstellen. Dieser würde durch den Wechsel auf Galac-

tose und damit verbundene Änderungen im NADP/NADP(H) und NADP/NAD Level verursacht werden.

*KlGal80p* bindet NAD(P) mit deutlich niedrigerer Affinität als *ScGal80p* (Blüher *et al.*, 2014). Beide Gal80p Homologe binden NADP mit höherer Affinität als NAD und die oxidierte Form mit höherer Affinität als die reduzierte. In *K. lactis* hat sowohl NAD als auch NADP einen negativen Effekt auf die Interaktion von *KlGal80p* und *KlGal4p*. Trotz der niedrigeren Affinität von *KlGal80p* für Dinukleotide ist die relative Differenz der Affinität für die jeweils reduzierte oder oxidierte Form von NAD oder NADP zwischen *ScGal80p* und *KlGal80p* doch ähnlich (Blüher *et al.*, 2014).

Bezüglich der Dinukleotidbindung des Repressors bestehen noch offene Fragen: Welche Funktion hat die Bindung von NAD(P) für den GAL-Schalter und wie sind die großen Unterschiede in der Affinität für Dinukleotide zwischen beiden Gal80p-Homologen zu erklären? Zur Klärung dieser Fragen wurden bereits verschiedene Varianten, die in der Dinukleotidbindung gestört sind, konstruiert: Gal80p-W31G, -W31A, -G24 und weitere (Kumar *et al.*, 2008; Schmidt, 2010). Eine verstärkte Repression, wie sie bei einem negativen Effekt der Dinukleotidbindung auf die Gal4p-Gal80p-Interaktion zu erwarten gewesen wäre, zeigten die Mutanten jedoch nicht. Einige bindungsdefiziente Varianten führten sogar zu einer schwächeren Repression.

### 1.3.3 Der Galactosesensor - Gal1p/Gal3p

#### Funktion und Struktur

*ScGal3p* und *KlGal1p* sind die Galactosesensoren, welche durch ihre Interaktion mit Gal80p die Freigabe von Gal4p und damit die Induktion ermöglichen. Sowohl die Interaktion von *ScGal3p* mit *ScGal80p* (Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996; Yano und Fukasawa, 1997) als auch von *KlGal1p* mit *KlGal80p* (Zenke *et al.*, 1996) ist Galactose- und ATP-abhängig.

Gal1p übernimmt in *K. lactis* zwei Funktionen: eine regulatorische durch die Interaktion mit *KlGal80p* und eine enzymatische als Galactokinase. Durch eine *Whole Genome Duplication* liegen in *S. cerevisiae* zwei Homologe von Gal1p vor: *ScGal1p* und *ScGal3p*. *ScGal1p* und *ScGal3p* weisen zu circa 70 % Sequenzübereinstimmung

und zu circa 90 % Sequenzähnlichkeit auf. Die Sequenzmotive zur Bindung von Galactose und ATP sind in ScGal3p konserviert (Platt *et al.*, 2000; Thoden *et al.*, 2005). Es bindet Galactose und ATP wie eine Galactokinase, besitzt jedoch keine Galactokinaseaktivität. Diese Funktion übernimmt ScGal1p, während ScGal3p die regulatorische Funktion innehat. Durch die Insertion von nur zwei Aminosäuren (Serin und Alanin an Position 164 und 165) kann das für Galactokinasen typische Motiv GLSSSA(A/S)(F/L/I) und damit die enzymatische Aktivität von ScGal3p hergestellt werden (Platt *et al.*, 2000). Man geht davon aus, dass die Bindung von Galactose und ATP zu einer Konformationsänderung von ScGal3p führt, welche für die Interaktion mit ScGal80p benötigt wird (Thoden *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2008; Lavy *et al.*, 2012). Sowohl für ScGal1p als auch ScGal3p (allein sowie im Komplex mit ScGal80p, Galactose und ATP) wurden die Kristallstrukturen bereits gelöst (Thoden *et al.*, 2005; Lavy *et al.*, 2012). Für KlGal1p existiert noch keine Kristallstruktur. Jedoch haben Menezes *et al.* (2003) basierend auf der Struktur der Mevalonatkinase, welche wie ScGal1p, ScGal3p und KlGal1p zur Familie der GHMP-Kinasen (Galacto-, Homoserin-, Mevalonat-, Phosphomevalonatkinasen) gehört, die Struktur von KlGal1p modelliert. Sie postulierten, dass die Bindung von Galactose und ATP die obere und untere Lippenregion zusammenbringt und so die Interaktionsstelle mit KlGal80p geschaffen wird (siehe Kapitel 1.5.3).

## Regulation

Die Tatsache, dass in *S. cerevisiae* die beiden Funktionen von KlGal1p aus *K. lactis* durch die *Whole Genome Duplication* auf zwei Proteine aufgeteilt wurden, bildet einen der wesentlichen Unterschiede in der Regulation der GAL-Gene in beiden Hefen. Das Aufteilen verschiedener Funktionen unter durch Genduplikation entstandenen Genen ermöglicht eine bessere Genregulation der beiden entstandenen Proteine. Ein Protein, welches hingegen zwei Funktionen ausübt, kann diese schwerer optimieren, da jede Optimierung einer Funktion einen negativen Einfluss auf die andere haben kann. Die Funktionsaufteilung geht oft einher mit *Loss-of-function* Mutationen, wie es bei ScGal3p mit dem Verlust der Galactokinasefunktion geschehen ist.

Durch die Aufteilung der Funktionen unter ScGal1p und ScGal3p war es möglich, die beiden Proteine unterschiedlich reguliert zu exprimieren. ScGAL3 weist eine Basaltranskription unter nicht-induzierenden Bedingungen und eine nur wenig er-

höhte Expression unter induzierenden Bedingungen auf. Laut Hittinger und Carroll (2007) ist das Basallevel nötig, um die Induktion in Anwesenheit von Galactose anzutreiben und wird möglich durch die UAS im *ScGAL3*-Promotor und die damit verbundene autoregulatorische Expression. Sowohl Induktion als auch Repression der *ScGAL1* Expression erfolgen hingegen strikter und dynamischer. Durch vier UAS Bindestellen und das kooperative Binden von mehreren Gal4p Molekülen weist *ScGAL1* ein stark erhöhtes Expressionslevel unter induzierenden Bedingungen auf, welches nötig ist, um Galactose zu verwerten. Unter nicht-induzierenden Bedingungen hingegen führt das kooperative Binden mehrerer Gal80p an die hintereinander gebundenen Gal4p auch zu einer stärkeren Repression und dem Ausbleiben einer Basaltranskription (Hittinger und Carroll, 2007). Durch die unabhängige Regulation von *ScGal1p* und *ScGal3p* reagiert *S. cerevisiae* hoch sensibel auf Galactose.

In *K. lactis* hingegen zeigt *KIGAL1* eine sehr hohe Basaltranskription: 10-mal höher als jene von *ScGAL1* und 4-mal höher als die von *ScGAL3* (Hittinger und Carroll, 2007). Das Induktionslevel ist 4-mal höher als von *ScGAL3*, aber nur halb so hoch wie das von *ScGAL1*. In *K. lactis* werden hohe Basallevel von *KlGal1p* benötigt, um die Induktion in Gang zu bringen und auch hohe enzymatische Level, um die enzymatische Funktion auszuüben.

### **Austauschbarkeit**

*KlGal1p* und *ScGal1p*/*Gal3p* sind nur bedingt austauschbar. Sowohl *KIGAL1* als auch die Überexpression von *ScGAL1* können eine *Scgal3*-Deletion komplementieren (Bhat *et al.*, 1990, Bhat und Hopper, 1991, Meyer *et al.*, 1991). Jedoch kann *ScGAL3* nur durch Überexpression die fehlende Induzierbarkeit einer *Klgal1*-Deletion partiell (Expressionslevel 30 %) komplementieren (Zenke *et al.*, 1996). Durch den Austausch von *KIGAL80* durch *ScGAL80* können hingegen *ScGAL1*, *ScGAL3* als auch *KIGAL1* eine *Klgal1*-Deletion komplementieren (Zenke *et al.*, 1996). Dies zeigt, dass zwar *ScGal80p* mit *KlGal1p* interagieren kann, jedoch *KlGal80p* nicht oder nur schwach mit *ScGal1p* und *ScGal3p*. Hier bestehen offenbar Unterschiede in der Interaktion.

## 1.4 Modelle zur Interaktion der GAL-Regulatoren

Der Ort und die genaue Art der Interaktion der drei regulierenden Proteine des GAL-Schalters sind vielfältig untersucht und kontrovers diskutiert worden. Es existieren hierzu verschiedene Modelle, welche den Mechanismus der Induktion zu erklären versuchen. Dabei befassen sich das Allosterische Modell und das Dissoziationsmodell mit der Frage, ob es einen trimeren Komplex von Gal4p, Gal80p und ScGal3p (bzw. KIGal1p in *K. lactis*) gibt oder ob Gal80p sich im Zuge der Induktion von Gal4p löst.

### 1.4.1 Das Allosterische Modell

Das Allosterische Modell geht davon aus, dass ScGal80p auch in induzierten Zellen an ScGal4p gebunden bleibt (Parthun und Jaehning, 1992; Chasman und Kornberg, 1990; Leuther und Johnston, 1992). Galactose-aktiviertes ScGal3p bindet laut diesem Modell an ScGal80p, führt dadurch zu einer Konformationsänderung von ScGal80p, wodurch die Aktivierungsdomäne von ScGal4p frei und die Transkriptionsaktivierung ermöglicht wird. Alle drei Proteine bilden dabei auch unter induzierenden Bedingungen einen Komplex. Leuther und Johnston (1992) zeigten, dass an die Aktivierungsdomäne von VP16 fusioniertes ScGal80p auch in Gegenwart von Galactose ein GAL-Reportergen aktivierte. Man nahm daher an, dass ScGal80p auch unter induzierenden Bedingung noch an ScGal4p bindet. Platt und Reece (1998) bestätigten diese These, indem sie *in vitro* einen ScGal4p-ScGal80p-ScGal3p-Komplex nachwiesen, welcher an eine UAS-Bindestelle band. Auch Bhaumik *et al.* (2004) haben in FRET-Analysen die Dissoziation von ScGal80p von ScGal4p in Frage gestellt und auch Wightman *et al.* (2008) sind der Auffassung, dass ein trimerer Komplex, auch wenn er nur sehr kurzlebig sein mag, nicht ausgeschlossen werden kann. Abramczyk *et al.* (2012) postulieren schließlich einen ScGal4p-ScGal80p-ScGal3p-Komplex, der jedoch nur zu Beginn der Induktion besteht. Die GAL-Gene werden transkribiert, wobei jedoch ScGal80p an ScGal4p gebunden bleibt. Währenddessen wird ScGal3p durch ScGal1p abgelöst. Letzteres bildet daraufhin anstelle von ScGal3p einen Komplex mit ScGal4p und ScGal80p.

Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen anderer Arbeiten, welche ebenfalls durch Mikroskopie und Chromatin-Immunoprecipitationsexperimente zeigten, dass

ScGal80p in Anwesenheit von Galactose nicht mehr an promotorgebundenen ScGal4p bindet (Peng und Hopper, 2002; Jiang *et al.*, 2009; Zugowski, 2013).

### 1.4.2 Das Dissoziationsmodell

Das Dissoziationsmodell geht davon aus, dass Gal80p im Zuge der Induktion von Gal4p dissoziiert (Johnston, 1987). Peng und Hopper (2000) unterstützten das Dissoziationsmodell. Sie wiesen ScGal3p hauptsächlich im Cytoplasma nach und zeigten, dass ein membrangebundenes und vom Kern fern gehaltenes ScGal3p dennoch den GAL-Schalter anschaltet und diese Zellen wie der Wildtyp induzieren. Peng und Hopper (2002) zeigten durch ChIP (Chromatinimmunopräzipitation)-Analysen, dass in Galactose weniger ScGal80p an ScGal4p gebunden ist. Peng und Hopper (2002) postulierten ein Modell, wonach ScGal80p an cytoplasmatisches ScGal3p bindet und dort zurückgehalten wird, was zu weniger ScGal80p im Kern führt und so die Induktion ermöglicht. Jiang *et al.* (2009) bestätigten das Dissoziationsmodell durch Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen. Hier zeigte sich im Zuge der Induktion, dass die Menge an ScGal4p-gebundenem ScGal80p abnimmt. Sie zeigten auch, dass die Zeit, welche ScGal80p zur Dissoziation benötigt, mit der Zeit korreliert, welche zur Induktion der GAL-Gene benötigt wird (ca. 15 Minuten; Jiang *et al.*, 2009). Die Dissoziation von ScGal80p war von ScGal3p abhängig. Auch Egriboz *et al.* (2011) konnten *in vivo* durch Fluoreszenzmikroskopie keinen ScGal3p-ScGal4p-ScGal80p-Komplex nachweisen. Sie diskutierten zudem, dass es nur zu einem trimeren Komplex, wie er im EMSA (Platt und Reece, 1998) gezeigt wurde, kam, da die künstliche Gelumgebung für langsamere Austauschraten unter makromolekularen Komplexen sorgt. Zudem wurde eine ScGal3p-Variante genutzt, welche auch ohne Galactose an ScGal80p bindet. Constance Zugowski (Zugowski, 2013) konnte in ihrer Doktorarbeit durch ChIP-Experimente zeigen, dass kaum noch ScGal80p unter induzierenden Bedingungen an promotorgebundenen ScGal4p bindet. Durch Verwenden einer ScGal4p-Variante ohne Aktivierungsdomäne konnte sie zudem eine Bindung von ScGal80p an einer alternativen Bindestelle von ScGal4p ausschließen. Sowohl Jiang *et al.* (2009) als auch Egriboz *et al.* (2011) postulieren: Falls es einen trimeren Komplex gibt, kann dieser nur sehr kurzlebig sein.

## Das Induktionsprinzip

Bezüglich des genauen Induktionsprinzips und der Interaktion von Galactosesensor und Repressor bestehen noch weitere offene Fragen: Wo findet die Interaktion statt und bindet *ScGal3p/KlGal1p* an Gal4p-gebundenes oder an freies Gal80p, wodurch die Bindung an Gal4p verhindert wird?

### Ort der Interaktion

Entgegen den Ergebnissen von Peng und Hopper (2000), welche mit ausschließlich cytoplasmatischem *ScGal3p* noch eine Induktion beobachteten, zeigten Jiang *et al.* (2009), dass auch in Anwesenheit von ausschließlich kernlokalisiertem *ScGal3p* die Induktion ähnlich wie im Wildtyp abläuft. Sie konnten zudem zeigen, dass *ScGal3p* sowohl in An- als auch Abwesenheit von Galactose in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt ist. Wightman *et al.* (2008) zeigten ebenfalls, dass *ScGal3p* sowohl im Cytoplasma als auch im Kern mit *ScGal80p* interagiert. Das heißt, bereits schon vor der Induktion befindet sich *ScGal3p* im Kern, was die schnellen Induktionszeiten erklären kann. Jiang *et al.* (2009) konnten zudem beobachten, dass es im Zuge der Induktion zu einer Umverteilung eines kleinen Teils von *ScGal80p* vom Kern zum Cytoplasma kommt. Dieser Prozess ist von der Interaktion von *ScGal80p* mit *ScGal3p* abhängig. Egriboz *et al.* (2011) schlussfolgern schließlich aus ihren FRAP-Experimenten, dass die Austauschrate zwischen Kern und Cytoplasma nur sehr langsam und eher untypisch für ein shuttlendes Protein ist. Sie konnten zehn Minuten nach dem *Photobleaching* nur 15 % Wiederherstellung von *ScGal80p* im Cytoplasma und 8 % im Kern beobachten. Sie stellten daher das Shuttle von *ScGal80p* als zentralen Mechanismus des *GAL*-Schalters in Frage.

In *K. lactis* ist der Repressor *KlGal80p* immer kernlokalisiert. Hier kann das Shuttle des Repressors nicht Induktionsprinzip sein. Jedoch stellt sich hier die Frage, wie die Repression trotz hoher *KlGal80p*-Konzentration unter induzierenden Bedingungen durch die Konkurrenz um die *KlGal80p*-Bindung von *KlGal1p* mit *KlGal4p* überwunden werden kann. Zudem muss *KlGal1p* neben der Konkurrenz mit *KlGal4p* zur Induktion auch seiner enzymatischen Funktion nachgehen. Eine Modellanalyse ergab, dass nur 10 % des gesamten *KlGal1p* als Galactosesensor fungieren (Pannala *et al.*, 2010).

## Art und Weise der Interaktion

Wightman *et al.* (2008) bestätigten, dass ScGal3p mit freiem ScGal80p interagieren kann. Egriboz *et al.* (2011) schließen jedoch eine ausschließliche Interaktion von ScGal3p mit freiem ScGal80p aus. Diese würde voraussetzen, dass es keinen stabilen ScGal4p-ScGal80p-Komplex gibt, sondern einen schnellen Austausch von freiem ScGal80p mit an ScGal4p gebundenem ScGal80p. Ihre Photobleachingexperimente widerlegen dies jedoch. Allerdings zeigten Egriboz *et al.* (2011), dass ScGal4p unter induzierenden Bedingungen dynamischer an die UAS bindet und es zu einem schnelleren Austausch kommt als unter nicht-induzierenden Bedingungen.

Eine ebenfalls umstritten diskutierte Frage ist, in welcher molekularen Form Gal80p mit ScGal3p beziehungsweise KlGal1p interagiert, damit es zur Induktion kommt. Pilauri *et al.* (2005) gehen davon aus, dass die Bindung von ScGal3p mit einem ScGal80p-Monomer mit der Bildung von ScGal80p-Dimeren konkurriert. In der Folge der ScGal80p-ScGal3p-Interaktion stünden dann weniger ScGal80p-Dimere zur Verfügung, um mit ScGal4p zu interagieren. Dies beruht auf der Feststellung, dass die Dimerisierungsdomäne von ScGal80p und die ScGal3p-Interaktionsdomäne überlappen, was eine Vielzahl von sowohl in der ScGal3p-Bindung sowie der ScGal80p-Dimerisierung gestörten ScGal80p-Varianten gezeigt hatte. Egriboz *et al.* (2013) zeigen ebenfalls *in vivo* und *in vitro*, dass die Interaktion von ScGal80p mit ScGal3p die Bildung von ScGal80p-Dimeren und -Oligomeren reduziert.

Dieses Modell würde allerdings eine sehr hohe Affinität der ScGal3p-ScGal80p-Bindung ähnlich der ScGal4p-ScGal80p-Bindung und der ScGal80p-Dimerisierung (Melcher und Xu, 2001) bedingen. Für die KlGal80p-KlGal1p-Bindung hingegen konnte eine solch hohe Affinität nicht nachgewiesen werden (Anders *et al.*, 2006). Anders *et al.* (2006) gehen nach ihrem mathematischen Modell davon aus, dass die direkte Konkurrenz zwischen KlGal4p und KlGal1p um die Bindung an KlGal80p den Transkriptionsschalter ermöglicht und diese Konkurrenz die Interaktion von zwei monomeren KlGal1p mit einem KlGal80p-Dimer bedingt. Würde die KlGal80p-Dimerisierung mit der KlGal1p-KlGal80p-Interaktion konkurrieren, wie es Pilauri *et al.* (2005) vorschlugen, so hätte man in Galaktokinase-Inhibierungsassays unter hohen KlGal80p-Konzentrationen die vollständige Inhibierung der Galactokinaseaktivität von KlGal1p durch KlGal80p nicht mehr beobachten können (Anders *et al.*, 2006). Zudem konnte in Ultrazentrifugationsexperimenten unter Zugabe von

EDTA zur Stabilisierung des *KlGal80p*-Dimers ein *KlGal1p<sub>1</sub>-KlGal80p<sub>2</sub>-KlGal1p<sub>1</sub>*-Heterotetramer nachgewiesen werden. Sie räumen jedoch einen möglichen schwachen, negativen Effekt von *KlGal80p*-Oligomeren höherer Ordnung auf die *KlGal1p-KlGal80p*-Bindung ein.

Auch in der Co-Kristallstruktur (Lavy *et al.*, 2012) interagiert ein *ScGal80p*-Dimer mit zwei *ScGal3p*-Monomeren. Lavy *et al.* (2012) gehen jedoch basierend auf ihren strukturellen Daten nicht von einer kompetitiven Interaktion von *ScGal3p* und *ScGal4p* mit *ScGal80p* aus. Jedoch ist hier zu beachten, dass es sich in der Kristallstruktur lediglich um die *Gal4p*-Aktivierungsdomäne, nicht um das Volllängenprotein handelt. Inwieweit hier ein Unterschied in der Interaktion und Konkurrenz der *GAL*-Regulatoren in beiden Hefen besteht, bleibt noch zu klären.

## 1.5 Interaktionen des Repressors Gal80p

### 1.5.1 Gal4p-Gal80p-Interaktion

*Gal80p* bindet als Dimer an ein *Gal4p*-Dimer (Melcher und Xu, 2001). Hierdurch kommt es zur Verstärkung der Interaktion. *ScGal80p* bindet an den C-Terminus von *ScGal4p*, wobei allein die C-terminalen 30 Aminosäuren für eine Interaktion ausreichend sind (Ma und Ptashne, 1987b). Ebenfalls C-terminal liegt die Aktivierungsdomäne von *ScGal4p*. Das Überlappen von *ScGal80p*-Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne führt zum reprimierenden Effekt auf die Transkriptionsaktivierung durch die Bindung von *ScGal80p* an *ScGal4p*. Die C-terminale *ScGal80p*-Bindestelle von *ScGal4p* weist eine Sequenzübereinstimmung von 88 % mit dem C-Terminus von *KlGal4p* auf (Salmeron und Johnston, 1986, Wray *et al.*, 1987). Die Kristallstruktur von *ScGal80p* mit der Aktivierungsdomäne von *ScGal4p* (Kumar *et al.*, 2008) deutet an, dass *Gal4p* in der großen Vertiefung der *ScGal80p*-Struktur bindet. Die Auflösung der Struktur reicht jedoch nicht, um Aussagen darüber zu treffen, welche Aminosäureseitenketten zwischen dem Peptid und *ScGal80p* interagieren.

Die Kristallstruktur des *ScGal80p*-NAD-*ScGal4p*-AD-Komplexes zeigt eine Interaktion der *ScGal4p*-AD mit NAD (Kumar *et al.*, 2008). Dies könnte für einen Einfluss der Dinukleotidbindung auf den *GAL*-Schalter von Bedeutung sein (siehe Abschnitt 1.3.2). In der *KlGal80p-KlGal4p*-AD-Kristallstruktur liegt das Peptid jedoch von der

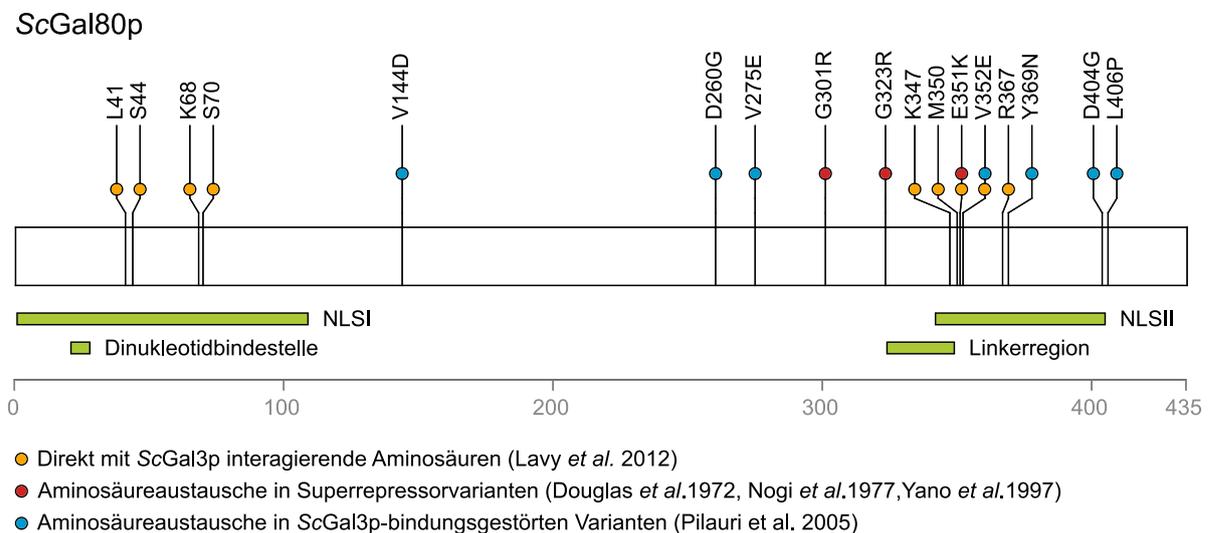
Rossmann-Falte entfernt (Thoden *et al.*, 2008). Die beiden Gal80p-Homologe scheinen die Gal4p-AD-Peptide in unterschiedlichen Orientierungen zu binden. Allerdings waren laut Thoden *et al.* (2008) die Seitenketten des ScGal4p-Peptids in der Kristallstruktur mit ScGal80p nur schlecht aufgelöst, wodurch ein genauer Vergleich der Gal4p-Gal80p-Interaktion in beiden Hefen bis dato nicht möglich gewesen ist. Offensichtliche Unterschiede in der Gal4p-Gal80p-Interaktion sieht man jedoch phänotypisch durch den Austausch der Proteine in die jeweils andere Hefe. ScGal4p im *K. lactis* Stammhintergrund führt zu stärkerer Repression (Riley *et al.*, 1987), was auf eine stärkere Repression von ScGal4p durch KlGal80p hindeutet. Auch die Expression von KlGal80p in *S. cerevisiae* führt zu einer stärkeren Repression. Zudem interagiert ScGal3p schwächer mit KlGal80p, was im *S. cerevisiae*-Stammhintergrund zu einer weiteren Verstärkung der Repression führt (Zenke *et al.*, 1996).

Weitere Hinweise für Unterschiede in der Bindung sind die Varianten ScGal80p-S0 und KlGal80p-S0. Sie sind beide nicht in der Lage, mit dem induzierenden Protein ScGal3p beziehungsweise KlGal1p zu interagieren, zeigen jedoch vollkommen verschiedene Phänotypen und zwar unabhängig vom jeweiligen Stammhintergrund. ScGal80p-S0 zeigt sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *K. lactis* einen superreprimierten Phänotyp. KlGal80p-S0 hingegen ist in beiden Hefen konstitutiv induziert. Unterschiede in der Gal80p-Gal4p-Bindung könnten diese unterschiedlichen Phänotypen erklären.

### 1.5.2 ScGal80p-ScGal3p-Interaktion

Es existieren verschiedene mutierte ScGal80p-Varianten, welche in der Interaktion mit ScGal3p gestört sind (Abbildung 1.2). Es sind drei ScGal80p-Varianten beschrieben, welche einen superreprimierten, sprich nicht mehr induzierbaren, Phänotyp bewirken: ScGal80p-S0 (G301R), ScGal80p-S1 (G323R) und ScGal80p-S2 (E351K) (Douglas und Hawthorne, 1972; Nogi *et al.*, 1977; Yano und Fukasawa, 1997). Weitere in der ScGal3p-Bindung gestörte ScGal80p-Varianten (V144D, D260G, V275E, V352E, Y369N, L406P, D404G) wurden durch Pilauri *et al.* (2005) identifiziert. ScGal80p-Varianten mit einem Austausch im Bereich von Aminosäure 351 bis 406 sind laut Pilauri *et al.* (2005) besonders oft in der ScGal3p-Bindung gestört. Ein Protease-Inhibitions-Assay zeigte außerdem, dass die Aminosäure 331 von ScGal80p durch ScGal3p vor Abbau geschützt wird (Timson *et al.*, 2002). Nogi und Fukasawa (1989)

zeigten, dass die Deletion der Aminosäuren 322 bis 340 von ScGal80p zu einem Superrepressor-Phänotyp führt. All diese Veränderungen häufen sich in einem zentralen Bereich des Proteins.



**Abbildung 1.2 ScGal80p-Karte mit Proteindomänen und für die ScGal3p-Interaktion relevanten Aminosäuren.** Die Karte zeigt die Aminosäureaustausche von ScGal80p, welche zum Verlust der Interaktion mit ScGal3p führen, die Aminosäuren, welche direkt mit ScGal3p interagieren (Kristallstruktur Lavy *et al.*, 2012) sowie wichtige andere Domänen. Die Karte wurde mit Hilfe von Protein Painter (<http://explore.pediatriccancergenomeproject.org/proteinPainter>) erstellt.

Durch die Co-Kristallstruktur von ScGal80p mit ScGal3p (Lavy *et al.*, 2012) konnte die strukturelle Grundlage zweier superreprimierender Varianten aufgeklärt werden. Die Aminosäure E351 in Wildtyp-ScGal80p interagiert mit R376 in ScGal3p durch eine Ionenbindung (Lavy *et al.*, 2012). In der Variante ScGal80p-S2 (E351K) ist diese Interaktion gestört. Glycin 301 hingegen ist nicht direkt an der ScGal3p-Bindung beteiligt. Ein Arginin an dieser Stelle hat jedoch negative strukturelle Auswirkungen auf eine nahe gelegene Interaktionsstelle (Lavy *et al.*, 2012). Die Kristallstruktur zeigt weiterhin, dass ScGal3p während der Interaktion in seiner geschlossenen Konformation vorliegt, welche durch die Bindung von Galactose und ATP induziert wird. Die ScGal3p-Bindung scheint leichte Konformationsänderungen in ScGal80p zu bewirken, die jedoch anscheinend nicht ausreichen, um die Interaktion mit der ScGal4p-Aktivierungsdomäne zu verändern (Lavy *et al.*, 2012).

Durch die Co-Kristallstruktur konnten die direkten Interaktionsstellen beider Pro-

teine ermittelt werden. Hier zeigte sich, dass bei der *ScGal3p-ScGal80p*-Interaktion ein  $\beta$ -Strang von *ScGal3p* ( $\beta$ 10) die  $\beta$ -Faltblattstruktur der Dimerisierungsdomäne von *ScGal80p* verlängert. Die Interaktion von *ScGal3p* mit *ScGal80p* erfolgt über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken (Lavy *et al.*, 2012) und direkte Bindungen (Aminosäuren L41, S44, K68, S70, K347, I349, M350, E351, V352 und R367 von *ScGal80p*; nach Abbildung S2 in Lavy *et al.*, 2012). Die Interaktion erfolgt hauptsächlich über die sogenannten Lippenregionen (*Upper* und *Lower Lip*) von *ScGal3p*.

Die Tatsache, dass die N-terminalen Aminosäuren von *ScGal80p*, welche direkte Interaktionen mit *ScGal3p* eingehen, nicht zuvor über Mutationsstudien identifiziert werden konnten (Abbildung 1.2), könnte damit erklärt werden, dass viele einzelne Aminosäureaustausche in *ScGal80p* einen starken Einfluss auf die gesamte Struktur und daher auch auf die Interaktion mit anderen Proteinen haben können (Melcher, 2005). Interaktionsgestörte Varianten zu identifizieren, die nicht in ihrer Gesamtstruktur beeinträchtigt sind, gestaltet sich bei *Gal80p* schwierig.

### 1.5.3 *KlGal80p-KlGal1p*-Interaktion

Die genauen Interaktionsstellen zwischen *KlGal80p* und *KlGal1p* sind bisher nicht bekannt. Es existieren lediglich wenige Varianten, welche eine Störung der Interaktion aufweisen. So führen die zu den *ScGal80p*-Superrepressorvarianten analogen Aminosäureaustausche in *KlGal80p*: *KlGal80p-S0* (G302R) und *KlGal80p-S2* (E367K) zu einer Störung der *KlGal1p*-Interaktion (Zenke *et al.*, 1999). *KlGal80p-S1* zeigt eine reduzierte Interaktion mit *KlGal1p* (Zenke *et al.*, 1999, Menezes *et al.*, 2003). Obwohl die analogen Aminosäureaustausche in *ScGal80p* und *KlGal80p* jeweils die Bindung zum induzierenden Protein stören, führen sie dennoch bei der *KlGal80-S0*- und der *KlGal80-S1*-Mutante nicht zum gleichen Phänotyp wie bei den Mutanten *ScGal80-S0* und *-S1*. Nur die *KlGal80-S2*-Mutante zeigte den gleichen Phänotyp wie *ScGal80-S2* (Zenke *et al.*, 1999). Der *KlGal80-S1* (G324R) exprimierende Stamm hingegen war noch durch Galactose induzierbar, jedoch mit 50 % geringerem Expressionslevel. Statt des superreprimierten Phänotyps zeigte der *KlGal80-S0* (G302R) exprimierende Stamm konstitutive Induktion. Eine weitere Variante *KlGal80p-R10* (M366V) zeigte eine höhere Affinität für *KlGal1p* und suppressierte den nicht induzierbaren Phänotyp eines Stamms mit der in der *KlGal80p*-Interaktion gestörten *KlGal1p-18*-Variante (Aminosäureaustausch D108A) (Menezes *et al.*, 2003). Dies deutet ebenfalls auf ei-

ne Funktion des *KlGal80p*-C-Terminus bei der *KlGal80p*-*KlGal1p*-Interaktion hin. In der Kristallstruktur (Thoden *et al.*, 2007) von *KlGal80p* befindet sich zwischen diesen Mutationen in der Region von Aminosäure 328 bis 362 eine ungeordnete Region. Thoden *et al.* (2007) vermuten hier eine Bindestelle mit *KlGal1p*. In dieser Region liegen zudem fünf der von Lavy *et al.* (2012) identifizierten direkten Interaktionen von *ScGal80p* mit *ScGal3p*. Das alleinige Fragment von Aminosäure 267 bis 404 von *KlGal80p* konnte jedoch im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment keine Interaktion mit *KlGal1p* zeigen (Menezes *et al.*, 2003). Interessanterweise weist diese Region, als sogenannte Linker-Region (Aminosäuren 326 - 365) bezeichnet, die größten Sequenzunterschiede zwischen beiden Gal80p-Homologen auf (Zenke *et al.*, 1993). Menezes *et al.* (2003) stellten ein Modell für die Interaktion von *KlGal1p* mit *KlGal80p* auf. Sie gingen davon aus, dass *KlGal1p* zwei Regionen (*Upper* und *Lower Lip*) besitzt, welche sich durch Bindung von ATP und Galactose schließen und so die Interaktion mit *KlGal80p* ermöglichen. Innerhalb dieser Regionen befinden sich auch die Aminosäuren, deren Austausch die *KlGal1p*-*KlGal80p*-Interaktion stört. Zwischen diesen „Lippen“ befindet sich eine Region, in der vor allem Mutationen liegen, welche zu einer konstitutiven Bindung an *KlGal80p* führen. Die Autoren vermuten weiterhin, dass alle von ihnen untersuchten *KlGal1p*-Deletionsmutanten keine *KlGal80p*-Bindung mehr zeigten, da jeweils eine Region beschädigt wurde, die für die Bindung notwendig ist und sich diese Regionen über einen weiten Teil des Proteins erstrecken.

## 1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Das *GAL*-System ist einer der am besten untersuchten Transkriptionsschalter. Dieses Wissen nutzen zahlreiche Anwendungen, begonnen beim Hefe-Zwei-Hybridsystem, der heterologen Genexpression in Hefe sowie der industriellen Nutzung von Hefe in der Lebensmittelindustrie oder der Ethanolproduktion. Die Beantwortung der noch offenen Fragen gerade zu den Details dieses Regulierungssystems wird es ermöglichen, in diesen Anwendungen auch die kleinsten Stellschrauben des *GAL*-Schalters zu regulieren und zu optimieren.

Ziel dieser Arbeit war es *Gal80p*, eines der zentralen Schlüsselproteine des *GAL*-Regulationsschalters, auf jene zentralen Unterschiede zwischen den beiden homologen *Gal80p* aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* näher zu untersuchen. Der genaue Mechanismus der Induktion vom Galactosesignal, über den Galactose-Sensor *ScGal3p* bzw. *KlGal1p* und das Aufheben des reprimierenden Effekts von *Gal80p* auf *Gal4p* ist bis heute nicht gänzlich geklärt. Dabei sind besonders die Unterschiede in der Lokalisation der regulatorischen Proteine seit langem Gegenstand kontroverser Diskussionen. Während *ScGal80p* in der gesamten Zelle verteilt ist, ist *KlGal80p* ausschließlich kernlokalisiert. Auch unter induzierenden Bedingungen ist der Repressor noch im Kern vorhanden. Innerhalb dieser Arbeit sollte daher zunächst die Ursache für die unterschiedliche Lokalisation von *Gal80p* sowie der Einfluss einer zuvor (Tews, 2009) konstruierten, in der Kernlokalisation gestörten *KlGal80p*-Variante auf den Regulationsmechanismus untersucht werden. Die Ursache für den dabei gefundenen superreprimierten Phänotyp dieser *KlGal80p*-Doppelmutante galt es daraufhin zu klären. Zudem sollte der Abhängigkeit der *KlGal1p*-Lokalisation von der Lokalisation von *KlGal80p* auf den Grund gegangen werden.

Ein weiterer zentraler Unterschied von *ScGal80p* und *KlGal80p* umfasst die unterschiedliche Affinität für NAD(P). Die Dinukleotidbindung gilt als möglicher Mechanismus zur Verknüpfung des metabolischen Zustands der Zelle mit der Induktion der *GAL*-Gene. Daher war es auch Gegenstand dieser Arbeit, die Analysen an verschiedenen, in der Dinukleotidbindung beeinflussten Varianten fortzusetzen.

Diese Analysen sollen einen Beitrag zum vollständigen Verständnis dieses für Forschung und Industrie so bedeutenden Regulationsschalters leisten.

# 2 MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Chemikalien

---

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5 : 1) Lösung (30 %)	Roth
Adenin	AppliChem
Adenosine 5'-triphosphat	Sigma
Agar-Agar	Roth
Agarose	Serva
L-Aminosäuren	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	AppliChem
Anti-DIG-AP-Konjugat	Roche
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Kalziumchlorid	Riedel-de Haën
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
5-Fluororotsäure (5-FOA)	ForMedium
Formaldehyde solution	Roth
D-Fructose-1,6-bisphosphate sodium salt hydrate	Sigma
D(+)-Galactose	Formedium
D(+)-Glucose	Roth
Glycerol	Serva
Glycin	AppliChem

---

Hefeextrakt	BD Difco
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Imidazol	Merck
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
D(+)-Lactose	Roth
Lithiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid	Roth
Manganchlorid	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth
NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid)	AppliChem
NADP (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)	AppliChem
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
NBT (Nitrotetrazoliumblau-Lösung)	Diagnostic Chemicals
Nonidet P40	Roche
ONPG	AppliChem
Pepton	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) (25:24:1)	Roth
$\rho$ -Phenylendiamine	Sigma
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Roth
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma Aldrich
Ponceau S	Roth
Rubidiumchlorid	AppliChem
Salzsäure	Roth
Sorbitol	Roth
SSC	AppliChem

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem
Triton X-100	AppliChem
Trypton	Serva
Tween 20	Roth
Uracil	AppliChem
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-DL-galactopyranosid)	ForMedium
X-Phosphat-Lösung (5-Brom-4-Chlor-3- Indolylphosphat	BioVectra
Xylencyanol	Sigma
<i>yeast nitrogen base</i> (YNB)	BD
Zymolyase 100T	Amsbio

## 2.1.2 Stämme

### 2.1.2.1 *Kluyveromyces lactis*

**Tabelle 2.2** *Kluyveromyces lactis* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
JA6	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade1-600 adeT-600 trp1-11 ura3-12 LAC9-2</i>	Breunig und Kuger, 1987
JA6/D801R	<i>gal80-<math>\Delta</math>1::Scura3</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1993
JA6/D802	<i>gal80-<math>\Delta</math>2::ScURA3</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1993
JA6/D1D802R	<i>gal1::ura3, gal80-<math>\Delta</math>2::ura3</i>	Zachariae, 1994
JA6/D1R	<i>gal1::ura3</i>	Zachariae, 1994
JA6/G80M	<i>GAL80-(c-myc)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop)	Diese Arbeit
JA6/G80-KR56A	<i>gal80-K5A/R6A-(c-myc)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop)	Diese Arbeit
JA6/G80W31A	<i>gal80-W31A</i>	Diese Arbeit
JA6/G80W31F	<i>gal80-W31F</i>	Diese Arbeit
JA6/G80SW	<i>gal80-SW</i> ( <i>Domain-Swap</i> -Variante mit Austausch der Aminosäuren 26–38 aus <i>KlGal80p</i> gegen jene aus <i>ScGal80p</i> )	Diese Arbeit

JA6/G80SW31	<i>gal80-SW31</i> (analog zu <i>gal80-SW</i> mit zusätzlicher Mutation für Aminosäureaustausch W31A)	Diese Arbeit
JA6/G80SV40	<i>GAL80-SV40</i> (kodiert für <i>KlGal80p-SV40</i> mit N-terminaler SV40-NLS* und C-terminalem c-myc Epitop)	Diese Arbeit
JA6/G80SVKR	<i>gal80-SVKR</i> (kodiert für <i>KlGal80p-SVKR</i> mit N-terminaler SV40-NLS*, C-terminalem c-myc Epitop und Aminosäureaustausch K5A/R6A)	Diese Arbeit

\* Sequenz: MGAPPKKKRKVA

### 2.1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

**Tabelle 2.3** *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
FI4 <i>sin4</i> $\Delta$ <i>Scgal80</i> $\Delta$	<i>sin4::HIS5 gal80::URA3</i>	Schmidt, 2010
FI4 <i>sin4</i> $\Delta$ <i>ScGAL80</i>	<i>sin4::HIS5, ScGAL80</i>	Diese Arbeit
FI4 <i>sin4</i> $\Delta$ <i>ScGAL80KR56A</i>	<i>sin4::HIS5, Scgal80-K5A/R6A</i>	Diese Arbeit
I4 <i>gal80::his</i>	<i>gal80::HIS5</i>	Langhammer, R.

### 2.1.2.3 *Escherichia coli*

**Tabelle 2.4** *Escherichia coli* Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS-RARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
XL10-Gold	Tet <sup>R</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>R</sup> ) Amy Cam <sup>R</sup> ]	Stratagene

## 2.1.3 Konstruktion von Hefestämmen durch *gene replacement*

### In *K. lactis*

Das *gene replacement* in *K. lactis* erfolgte durch Restriktionsverdau der angegebenen Integrationsplasmide (Tabelle 2.5) mit *XhoI* und anschließender Transformation. Das Plasmid (2–5  $\mu$ g) wurde in einem 100  $\mu$ l Restriktionsverdauansatz geschnitten. Der Verdau wurde inaktiviert und über Säulchen gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.11) und in 20  $\mu$ l Elutionspuffer aufgenommen. Der gesamte 20  $\mu$ l-Ansatz wurde für die Transformation in kompetente Hefezellen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2). Die Hefezellen wurden zunächst auf YEPG-Platten (siehe Abschnitt 2.1.4.1) ausplattiert. Nach circa 8 Stunden bei 30 °C oder Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf FOA-Platten (siehe Abschnitt 2.1.4.1) überstempelt und bei 30 °C inkubiert. *XhoI* schneidet die verwendeten Plasmide so, dass auf dem zu integrierenden Fragment das jeweilige Gen sowie 1–2 kb der flankierenden *Upstream*- und *Downstream*-Sequenzen liegen. Für den Nachweis der korrekten Integration und eines erfolgreichen *gene replacements* wurden Test-PCR-Analysen an chromosomaler DNA der konstruierten Stämme durchgeführt. Mittels verschiedener Primerkombinationen wurde auf das Vorhandensein des zu integrierenden Gens

sowie die korrekte Integration am Locus getestet und eine Tandemintegration ausgeschlossen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.9 aufgelistet. Zusätzlich wurde eine Mehrfachintegration mittels Southern Blot (siehe Abschnitt: 2.2.19) ausgeschlossen. Die Expression der *KlGal80p*-Varianten (-SV40, -SVKR, -G80M, -KR56A, -W31A, -W31F, -SW31, -SW) wurde zudem mittels Western Blot überprüft.

**Tabelle 2.5** *Gene replacement in K. lactis*

Stamm	Verwendetes Integrationsplasmid
JA6/G80M	pI80Myc
JA6/G80-KR56A	pI80KR56A
JA6/G80W31A	pKlGal80W31A
JA6/G80W31F	pI80W31F
JA6/G80SW	pI80KlG80-2638
JA6/G80SW31	pI80SW31
JA6/G80SV40	pI80SV40
JA6/G80SVKR	pI80KR56ASV40

### In *S. cerevisiae*

Für den Stamm FI4  $\sin 4_{\Delta}$  ScGAL80KR56A wurden mittels PCR mit den Primern M13 und AT181 sowie AT185 und AT186 an pBScG80 Fragmente generiert, die als Template für eine Fusions-PCR mit den Primern M13 und AT186 dienen. Das PCR Produkt wurde in FI4  $\sin 4_{\Delta}$   $\text{gal}80_{\Delta}$  integriert. Zur Konstruktion des Stamms FI4  $\sin 4_{\Delta}$  ScGAL80 wurde das Plasmid pBScG80 mit *NcoI* und *SnaBI* verdaut und das *ScGAL80* tragende Fragment in den Stamm FI4  $\sin 4_{\Delta}$   $\text{gal}80_{\Delta}$  integriert. Hierzu wurden die PCR-Ansätze über Säulchen (siehe Abschnitt 2.2.11) gereinigt und anschließend 2–4  $\mu\text{g}$  der Fragmente in kompetente Hefezellen transformiert. Zunächst wurde auf YEPD Platten ausplattiert und nach Inkubation über Nacht bei RT diese Platten auf FOA-Platten überstempelt. Die korrekte Integration wurde über PCR (Primer: Tabelle 2.9) überprüft.

Tabelle 2.6 Primer für *gene replacement* in *S. cerevisiae*

Kürzel*	Primernamen	Sequenz (5'-3')
AT181	ScGal80KR56Afw	ATGGACTACAACGCTGCTTCTTCG GTCTCAACC
AT182	KlGal80_Rep_ScG80_fw	GACCAGCGTATAACAATCTCGATA GTTGGTTTCCCGTTCTTTCCACTCC CGTCATGAACAATAACAAACGG
AT183	Myc_Rep_ScGal80_bw	CGTTTTTATAACGTTTCGCTGCACT GGGGCCAAGCACAGGGCAAGA TGCTTTTACTAGACTCTAGATGA
AT184	KlGal80KR56ARepScG80fw	GACCAGCGTATAACAATCTCGATA GTTGGTTTCCCGTTCTTTCCACTCC CGTCATGAACAATAACGCTGCT
AT185	ScGal80KR56Abw	GGTTGAGACCGAAGAAGCAGCGT TGTAGTCCAT
AT186	Sc_Replacement_fw	GGCAGCCGTTGTCTTGCAAA
AT199	ScGal80_Prom_fw	GAACCTGAATATATATACATCAC ATATCACTGCTGGTCCTTGCCGAC CAGCGTATAACAATCTCG
AT200	ScGal80_Term_bw	CAGAACAAGAAATGATATGGTTG TTTTACATAGATATATACTCAGTA TTCGTTTTTATAACGTTTCGCT
M13	GAL80.RIGHT	CATGCACGAAAAAGGGAAAT
S119	ScKlGAL80RVn	GTTTTTATAACGTTTCGCTGCACTG GGGGCCAAGCACAGGGCAAGAT GCTTTTATATCATTATTTTCGACA CGTCAAGAGT

\* Alle mit AT angegebenen Primer wurden innerhalb dieser Arbeit konstruiert. Alle weiteren Primer waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

## 2.1.4 Medien und Anzucht

### 2.1.4.1 Hefe

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte in Voll- (YEP: 1 % Hefeextrakt; 2 % Pepton; YEPD: 2 % Glucose; YEPG: 2 % Galactose) bzw. Minimalmedium (YNB: 0,67 % yeast nitrogen base) (Sherman, 1991; Wickerham, 1951; Burkholder, 1943) bei 30 °C unter ständigem Schütteln. Dem Minimalmedium wurde ein 20-facher Aminosäure-/Basen-Mix (224 mg/l Adenin; je 768 mg/l L-Uracil; L-Histidin; L-Tryptophan; L-Arginin und L-Methionin; 288 mg/l Tyrosin; 960 mg/l D/L-Phenylalanin; je 576 mg/l L-Leucin; D/L-Lysin; L-Isoleucin; L-Valin; L-Threonin) zugegeben. Zur Selektion prototropher Stämme fehlte dem Aminosäure-/Basen-Mix die entsprechende Base (Uracil) bzw. Aminosäure (Tryptophan). Die Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose oder Lactose) wurden ausgehend von einer 20%igen Stammlösung dem Medium zugegeben. Die Endkonzentration lag bei Anzuchtmedien bei 2 %. Feste Nährböden enthielten 2 % Agar. Alle Medien wurden vor deren Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zucker- und Aminosäure-/Basen-Lösungen wurden separat für 10 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend dem sterilen Medium zugegeben.

Zum Nachweis der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von Lac4p wurde den Medien für feste Nährböden nach dem Autoklavieren in DMF gelöstes X-Gal (ForMedium) mit einer Endkonzentration von 40  $\mu$ g/ml im Medium zugefügt.

Zur Selektion auf Zellen ohne funktionales *URA3*-Gen wurden die Zellen auf FOA-Platten ausplattiert. FOA-Platten für *S. cerevisiae*-Stämme enthielten 0,67 % YNB; 2 % Agar; 2 % Glucose; 5 % Aminosäure-/Basen-Mix (ohne Uracil); 3,5 % Uracil-Stammlösung (2 mg/ml) sowie 0,1 % FOA (5-FOA: 5-Fluoroorotic acid). FOA Platten für *K. lactis*-Stämme enthielten 0,67 % YNB; 2 % Agar; 2 % Glucose; 5 % Aminosäure-/Basen-Mix (ohne Uracil); 5 % Uracil-Stammlösung (2 mg/ml) sowie 0,02 % FOA.

### 2.1.4.2 *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E.coli* Zellen erfolgte bei 37 °C in LB(*lysogeny broth*)-Medium (1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % Natriumchlorid) nach Bertani (1951). Die Selektion auf plasmidhaltige Zellen erfolgte in ampicillinhaltigem LB-Medium (50  $\mu$ g/ml), durch die über das Plasmid erworbene Ampicillinresistenz. Rosetta(DE3)pLysS Zel-

len wurden wie unter Abschnitt 2.3.7 beschrieben angezogen.

## 2.1.5 Plasmide

Tabelle 2.7 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pAG80	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>KlGAL80</i> unter <i>ScADH1</i> -Promotor	Zenke <i>et al.</i> , 1999
pC80	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid mit <i>KlGAL80</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1999
pCAG1	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid mit <i>KlGAL1</i> unter <i>ScADH1</i> - Promotor	Zachariae, 1994
pCGFPAG1	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid, kodiert für GFP- <i>KlGal1p</i> -Fusionsprotein unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors	Anders <i>et al.</i> , 2006
pCGFPAG1- <i>ura3Δ</i>	wie pCGFPAG1 jedoch <i>Scura3</i>	Anders <i>et al.</i> , 2006
pE1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>ScURA3</i>	Bianchi <i>et al.</i> , 1987
pEAG80	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>KlGAL80</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors	Zenke <i>et al.</i> , 1999
pEAG80S2	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>KlGal80-S2</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors	Zenke <i>et al.</i> , 1999
pEAG1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>KlGAL1</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors	Zachariae, 1994
pEAG1-209	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>KlGal1-209</i> (N261Y)	Vollenbroich <i>et al.</i> , 1999
pEAGK1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>E. coli GalK</i> unter <i>ScADH1</i> -Promotor	Kuger & Breunig
pEAG1-m1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>KlGal1-m1</i> (E254K)	Vollenbroich <i>et al.</i> , 1999
pEgal80NLS1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit GFP- <i>KlGal80-K5A/R6A</i> -Genfusion unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors (GFP N-terminal).	Tews, 2009
pEQRS80C1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit GFP- <i>KlGal80-C1</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors. ( <i>KlGal80p-C1</i> -Fragment: Aminosäure 2–39 mit N-terminalem GFP)	Tews, 2009

---

pEQRS80DC1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>GFP-KlGal80-DC1</i> ( <i>KlGal80p-DC1</i> -Fragment: AS 40-457 mit N-terminaler GFP-Fusion)	Tews, 2009
pETKlG80-2638	Expressionsplasmid für <i>KlGAL80-SW</i> mit N-terminalem His(6x)-Epitop ( <i>KlGal80p-SW</i> : <i>Domain Swap</i> -Variante mit Austausch der Aminosäuren 26–38 gegen jene aus <i>ScGAL80</i> )	Hey, 2011
pETNHKlG80	Expressionsplasmid für <i>KlGal80p</i> mit N-terminalem His(6x)-Epitop	L. Kapp
pGFPSKS	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>GFP-Scgal80-SKS</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors ( <i>ScGal80p-SKS</i> : Aminosäureaustausch der <i>ScGal80p</i> -Linker-Region (324–349) gegen jene aus <i>KlGal80p</i> (AS 325-365) mit N-terminaler GFP-Fusion.	AG Breunig, 2004
pI80	Integrationsplasmid welches <i>KlGAL80</i> mit flankierenden <i>upstream</i> und <i>downtream</i> Sequenzen trägt sowie <i>ScURA3</i>	Zachariae und Breunig, 1993
pI80Myc	Integrationsplasmid <i>KlGAL80-(c-myc)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop)	Tews, 2009
pI80HA	Integrationsplasmid <i>KlGAL80-(HA)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop)	Tews, 2009
pI80KlG80-2638	Integrationsplasmid mit <i>KlGAL80-SW</i> ( <i>KlGal80p-SW</i> : <i>Domain Swap</i> -Variante mit Austausch der Aminosäuren 26–38 gegen jene aus <i>ScGAL80</i> )	Hey, 2011
pKATUC4	<i>K. lactis</i> Vektor mit <i>KlCEN2-ARS1-KARS12-ScTRP1- ScURA3</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1993
pKlGal80	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>KlGAL80</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1993
pScGal80	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>ScGAL80</i> unter <i>KlGAL80</i> -Promotor.	Frank Zenke
YEplac195	<i>S. cerevisiae</i> Multikopievektor mit <i>URA3</i> -Marker.	Gietz und Sugino, 1988

---

Tabelle 2.8 Innerhalb dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pAG80KR56A	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>Klgal80-K5A/R6A</i> unter <i>ScADH1</i> -Promotor. Ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.12) an pAG80 mit den Primern: AT175 und A1.
pCAG80Myc	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid mit <i>KlGAL80-(c-myc)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop). pI80Myc wurde mit <i>SwaI</i> und <i>Van91I</i> verdaut und das <i>KlGAL80</i> tragende Fragment in den ebenso geschnittenen Vektor pCAG80-31 kloniert.
pCAG8056M = pCAG80KR56AMyc	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid mit <i>Klgal80-K5A/R6A-(c-myc)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop). pAG80KR56A wurde mit <i>NotI</i> und <i>Van91I</i> verdaut und das Fragment mit <i>ScADH1</i> Promotor und <i>Klgal80-K5A/R6A</i> N-Terminus wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pCAG80Myc kloniert.
pCGal1HA	<i>K. lactis</i> Centromerplasmid mit <i>KlGAL1-(HA)<sub>3</sub></i> (C-terminales Epitop). Konstruktion über InFusion Klonierung (siehe Abschnitt 2.2.14) des mit <i>NotI</i> und <i>SalI</i> geschnittenen Vektors pCAG1 und der PCR-Produkte: Primer: AT191 + AT194 und AT197+AT198 an genomischer DNA aus JA6 sowie AT195 + AT196 an pI80HA.
pEAG80-KR56A-SV40	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>Klgal80-SVKR</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors. Kodiert für <i>KlGal80p-SVKR</i> mit Aminosäureaustausch K5A/R6A und N-terminaler SV40-NLS-Fusion (MGAPPKKKRKVA). Konstruktion über InFusion Klonierung (siehe Abschnitt 2.2.14) des <i>SmiI</i> und <i>SpeI</i> geschnittenen Vektors pEAG80 und der PCR-Produkte: Primer: ADH1-G80-inFu-FW und ADH1-G80-inFu-RV an pEAG80 und G80-KR56A-InFu-FW und G80-KR56A-inFu-RV an pI80KR56ASV40.
pEgal80NLS1C1	<i>K. lactis</i> Multikopieplasmid mit <i>GFP-Klgal80-K5A/R6A-C1</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors (GFP- <i>KlGal80p-K5A/R6A-C1</i> : Fragment der N-terminalen 39 Aminosäuren von <i>KlGal80p-K5A/R6A</i> mit N-terminaler GFP-Fusion). Das an pEgal80NLS1 amplifizierte PCR-Fragment (AT6 + AT31) wurde mit <i>MluI</i> und <i>SmiI</i> verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.

- pEgal80NLS1GFPct *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-KlGal80-K5A/R6A* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors und mit C-terminaler GFP-Fusion. Die PCR-Fragmente mit den Primern: AT136 + AT83, AT125 + AT139 und AT138 + AT137 an pEgal80NLS1 wurden mit *XhoI* und *MluI* geschnitten, ligiert und das Ligationsprodukt als Template für eine erneute PCR (AT125 + AT138) eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in den mit *AjiI* und *NotI* geschnittenen Vektor pEgal80NLS1 ligiert.
- pEGFP-G80-S2 *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-KlGal80-S2* (E367K) unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors und mit C-terminaler GFP-Fusion. Es wurde eine Fusions-PCR (Primer: ADH1-fw + AT251) mit den an pEG80WTGFPct amplifizierten PCR-Fragmenten (Primer: ADH1-fw + AT250 und AT249 + AT251) durchgeführt. Das mit *MluI* und *SmiI* geschnittene Fusionsfragment wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pEG80WTGFPct integriert.
- pEG80WTGFPct *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-KIGAL80* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors und mit C-terminaler GFP-Fusion. Das PCR-Fragment (AT 5 + AT 142) an pEgal80NLS1GFPct wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Vektor pEgal80NLS1GFPct ligiert.
- pEGFPNLS *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-KlGal80-NT17* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (N-terminale 17 Aminosäuren von *KIGal80p* mit N-terminaler GFP-Fusion). Das mit den Primern AT30 und AT117 an pEQRS80 erzeugte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEGFP-KSKS *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-Scgal80-KSKS* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit *KIGal80p*-N-Terminus (AS 2-16) und -Linker-Region (AS 325-365) und N-terminaler GFP-Fusion). Das mit den Primern AT251 und AT253 an pEGFPSKS amplifizierte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEGFP-KINT-ScG80 *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-Scgal80-KINT* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit *KIGal80p*-N-Terminus (AS 2-16) und N-terminaler GFP-Fusion). Das mit den Primern AT251 und AT253 an pEScG80 amplifizierte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.

- pEGFP-KI56-ScG80 *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-Scgal80-KI56* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit *KIGal80p-K5A/R6A-N*-Terminus (AS 2-16) und N-terminaler GFP-Fusion). Das mit den Primern AT251 und AT254 an pEScG80 amplifizierte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEGFPSKS *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-Scgal80-SKS* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit Austausch der Linker-Region (324–349) gegen jene aus *KIGal80p* (AS 325-365) und N-terminaler GFP-Fusion). Das mit den Primern AT111 und AT112 an pGFPSKSneu erzeugte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEScG80 *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-ScGAL80* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (N-terminale GFP-Fusion). Das mit den Primern AT111 und AT112 an pScGal80 erzeugte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEScG80NES *K. lactis* Multikopieplasmid mit *GFP-Scgal80-L402A/L406A* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit Aminosäureaustausch L402A, L406A und N-terminaler GFP-Fusion) . Das mit den Primern AT111 und AT112 an pScGal80NES erzeugte PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pEScG8036 *K. lactis* Multikopieplasmid mit *Scgal80-36* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für N-terminale 36 Aminosäuren von *ScGal80p* mit N-terminaler GFP-Fusion). Das PCR-Fragment (AT6 + AT118) an pEScG80 wurde mit *MluI* und *SmiI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pEQRS80 kloniert.
- pETNHG80SW31  
= pETG802638W31A *E. coli* Expressionsplasmid mit *NHklgal80-SW31* (kodiert für N-terminal His(6x)-Epitop markierte *Domain-Swap*-Variante (Austausch der Aminosäuren 26–38 gegen jene aus *ScGal80p*) mit W31A-Mutation). Zur Generierung der Punktmutation wurden zwei PCR-Fragmente an pI80KIG80-2638 (Primer: AT161 + MH3 und AT160 + K8) amplifiziert. Diese wurden in einer Fusions-PCR (Primer: MH3 + K8) als Template eingesetzt. Das Fusionsfragmente wurde anschließend mit den Primern MH6 und MH7 zur Generierung von Restriktionsschnittstellen amplifiziert, mit *XhoI* und *Bpu1102I* verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pETKIG80-2638 kloniert.

- pETNHG80W31F *E. coli* Expressionsplasmid mit *NHklgal80-W31F* (kodiert für N-terminal His(6x)-Epitop markiertes *KlGal80p* mit Austausch W31F). Das PCR-Fragment (Primer: MH6 + MH7) wurde mit *XhoI* und *Bpu1102I* verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pETKlG80-2638 kloniert.
- pETNHKlG80KR56A *E. coli* Expressionsplasmid mit *NHklgal80-K5A/R6A* (kodiert für N-terminal His(6x)-Epitop markiertes *KlGal80p-K5A/R6A*). Das 1395 bp große *XhoI* und *Bpu1102I* Fragment aus pKlGal80KR56A wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pETNHKl80W31F kloniert.
- pGFPSKSneu *E. coli* Vektor mit *Scgal80-SKS* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (kodiert für *ScGal80p* mit Austausch der Linker-Region (324–349) gegen jene aus *KlGal80p* (AS 325–365) und N-terminaler GFP-Fusion). Zur Entfernung einer fehlerhaften Punktmutation in pGFPSKS wurde das mit den Primern AT111 und AT8 an pScGal80 erzeugte PCR-Fragment mit *Eco147I* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pGFPSKS kloniert.
- pI80KR56A  
= pI80NLS1CO *K. lactis* Integrationsplasmid mit *Klgal80-K5A/R6A*. pKlGal80KR56A wurde mit *Van91I* und *Eco81I* verdaut. Das Fragment, welches den N-Terminus von *KlGAL80-KR56A* trug, wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pI80Myc kloniert.
- pI80SW31  
= pI802638W31A *K. lactis* Integrationsplasmid mit *Klgal80-SW* (kodiert für *KlGal80p-Domain-Swap*-Variante (Austausch der Aminosäuren 26–38 gegen jene aus *ScGal80p*) mit W31A-Mutation). Zur Generierung der Punktmutation wurden zwei PCR-Fragmente an pI80KlG80-2638 (Primer: AT161 + MH3 und AT160 + K8) amplifiziert. Diese wurden in einer Fusions-PCR (Primer: MH3 + K8) als Template eingesetzt. Das Fusionsfragment wurde mit *SmiI* und *Eco81I* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pI80KlG80-2638 kloniert.
- pI80W31F *K. lactis* Integrationsplasmid mit *Klgal80-W31F*. Zur Generierung der Punktmutation wurden zwei PCR-Fragmente an pI80 (Primer: AT174 + K4 und AT173 + K25) amplifiziert. Diese wurden in einer Fusions-PCR (Primer: K4 + K25) als Template eingesetzt. Das Fusionsfragment wurde mit *Bsu36I* und *Van91I* geschnitten und das entstandene 534 bp Fragment in den ebenso geschnittenen Vektor pI80 kloniert.

---

pI80SV40	<i>K. lactis</i> Integrationsplasmid für <i>NLS-KlGAL80-(c-myc)<sub>3</sub></i> (kodiert für <i>KlGal80p</i> mit C-terminalem c-Myc-Epitop und N-terminaler SV40-NLS (MGAPPKKKRKVA)). Zwei PCR-Fragmente an pI80Myc (Primer: AT189 + K4 und AT188 + K25) dienten als Template für eine Fusions-PCR (Primer: K4 + K25). Das Fusionsfragment wurde mit <i>Eco81I</i> und <i>Van91I</i> geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pI80Myc kloniert.
pI80KR56ASV40	<i>K. lactis</i> Integrationsplasmid für <i>NLS-Klgal80-K5A/R6A-(c-myc)<sub>3</sub></i> (kodiert für <i>KlGal80p-K5A/R6A</i> mit C-terminalem c-Myc-Epitop und N-terminaler SV40-NLS (MGAPPKKKRKVA)). Zwei PCR-Fragmente an pI80KR56A (Primer: AT189 + K4 und AT187 + K25) dienten als Template für eine Fusions-PCR (Primer: K4 + K25). Das Fusionsfragment wurde mit <i>Eco81I</i> und <i>Van91I</i> geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pI80Myc kloniert.
pKlGal80W31A	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>Klgal80-W31A</i> . Ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.12) an pI80 mit den Primern: AT163 und A1.
pKlGal80KR56A =pKlGal80NLS1CO	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>Klgal80-K5A/R6A</i> . Ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.12) an pKlGal8080 mit den Primern: AT131 und A1.
pScGal80NES	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>Scgal80-L402A/L406A</i> . Ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.12) an pScGal80 mit den Primern: AT115 und AT113.
YEGFPG80	<i>S. cerevisiae</i> Multikopieplasmid mit <i>GFP-KlGAL80</i> unter Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors (N-terminale <i>GFP</i> -Fusion). Das mit den Primern AT124 und AT125 an pEQRS80 amplifizierte PCR-Fragment wurde mit <i>SacI</i> verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor YEplac195 kloniert.
YEScG80	<i>S. cerevisiae</i> Multikopieplasmid mit <i>GFP-ScGAL80</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors (N-terminale <i>GFP</i> -Fusion). Das <i>MluI-SmiI</i> -Fragment aus pEScG80neu wurde in den ebenso geschnittenen Vektor YEGFPG80 kloniert.
YEScG80NES	<i>S. cerevisiae</i> Multikopieplasmid mit <i>GFP-Scgal80-L402/L406A</i> unter Kontrolle des <i>ScADH1</i> -Promotors (N-terminale <i>GFP</i> -Fusion). Das <i>MluI-SmiI</i> -Fragment aus pEScG80NES wurden in den ebenso geschnittenen Vektor YEGFPG80 kloniert.

---

## 2.1.6 Oligonukleotide

**Tabelle 2.9** Zur Plasmidkonstruktion, PCR-Kontrolle und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Kürzel*	Primernamen	Sequenz (5'-3')
AA	ADH1-fw	CAATATTTCAAGCTATAACCAAGC
AJ25	F08393-(GAL1)-F	GCTGTAGCGGAACATCATGTC
AJ26	F08393-(GAL1)-R	CTGGGAACTTGAACGGAGTAG
AT5	KlG80SmiIBw	ACGTAAGCAAGCCATAACGGATTCC
AT6	GFPfw	GGGATTACACATGGCATGGATGAACT
AT8	ScG80SondeBw	AATCGGTTACCACGCTCATC
AT26	UASKlGal1fw	GCAGGTTGTCGTGTTATGATAGCAAC
AT30	C1MluIKlG80Fw	GCGAACGCGTAACAATAACAAACGGTC
AT31	C1SmiIKlG80Bw	GCGGATTTAAATGGCTAAGAAATGCGT
AT36	C4MluIKlG80Fw	TAATACGCGTGAGGTGGTCAAGAA
AT50	UASKlGal1klein3fw	GCATAGTCTTCCGCTCATTCCG
AT60	KlGal80-(-26)	ACACAATATCTCGGCAGGACGG
AT65	klg80	TCGATGGCACCGTGGAT
AT80	KlGAL80-798	GGAATATTGGAAAATGGGAAGG
AT83	KlGal80_XhoI_rev	GTCGCTCGAGTATCATTATTTTCGACACGT CAAG
AT90	KlGAL80-635	CGACATCGAGAGCGGTGTG
AT99	KlGal80-Mlu-Rv	CGTTTCCCATTCTCATCCA
AT113	ScGal80NESMuta	TAACCTGTGTAATATCGCAGCATCCATCG CGGTGGGAAAGCCTTCG
AT115	ADH1fw	ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA GCATTGGTAA
AT117	NLS_Smi_Bw	CTACTCGATGGCACCGTGGAATTTAAATG GC
AT118	ScG80_36_Smi_Bw	GCGGATTTAAATTAATGTGTCTTGATTG
AT124	Gal80_SacI_bw	GTAGGAGCTCGCTGGTTTGAGTTTTC
AT125	ADH_SacI_fw	AAAACAGTCCCCCTGAGCTCCA
AT126	Xho_ScG80NES	TATACTCGAGGGCTTTCCACCTT
AT131	KlGal80NLS1CO	GACGGCATCATGAACAATAACGCTGCTTC CAAATTATCCACGGTGCC
AT136	KlGal80_ATG_Mlu	GTGCACGCGTATGAACAATAACGCAG

AT137	GFPXhoI_fw	GAGCTCGAGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
AT138	GFPStopp_rw	CATAGATTTGAAGTTTATTTATTTGTATAG TTCATCCATGCC
AT139	ADH_MluI_bw	TATTACGCGTAGCCTGCAGGCGGAATT
AT142	MluATGWTG80fw	AGGCTACGCGTATGAACAATAACAAACG GTCCAAATTATC
AT146	HA_bw	TCATAGGGATAGCCCCGCATA
AT155	Upstream_Gal80_fw	GATTTTCGACACAGTGTGGAG
AT156	Downstream Gal80_bw	GCTATGTCAGAATGGAACGG
AT157	ScURA3left	CCTGTTGCTGCCAAGCTATT
AT158	ScURA3right	ATATGCTTCCCAGCCTGCTT
AT160	KIG80-2638_W31A_fw	TGCTAAAGGTGCTGCTATTAAGACTCATT ATCCAGCCATA
AT161	KIG80-2638_W31A_bw	TATGGCTGGATAATGAGTCTTAATAGCAG CACCTTTAGCA
AT163	KIGal80W31A	TTA ACC AGT GGT AAA AGT GCT GTT GCC AAG ACG CAT T
AT173	KIG80_W31F_fw	CCAGTGGTAAAAGTTTCGTTGCCAAGACG CATTTC
AT174	KIG80_W31F_bw	GAAATGCGTCTTGGCAACGAACTTTTAC CACTGG
AT175	KIG80KR56A_fw	CATGAACAATAACGCTGCTTCCAAATTAT CCACGGTGCC
AT187	SV40NLS_KR56A_fw	ATGGGTGCTCCACCAAAAAAAAAAAGAA AAGTTGCTAACAATAACGCTGCTTCCAA
AT188	SV40NLS_KIG80_fw	ATGGGTGCTCCACCAAAAAAAAAAAGAA AAGTTGCTAACAATAACAAACGGTCC
AT189	SV40NLSKIG80_bw	AGCAACTTTTCTTTTTTTTTTTTGGTGGAGCA CCCATGATGCCGTCCTGCCGAGA
AT191	KIGal1_Prom_FOR	ACCGCGGTGGCGGCCGCTAACGTCTAGTT CCGTTTTCCATTCTAGCT
AT192	KIGal1_Prom_REV	AGCAACTTTTCTTTTTTTTTTTTGGTGGAGCA CCATTATTATTCTTATATTTCAGCCTTGT TT
AT193	KIGAL1-NLS_FOR	GGTGCTCCACCAAAAAAAAAAAGAAAAG TTGCTTCCGTTCCCTATTGTGCCAAC
AT194	KIGAL1_REV	TATGGGTATTCATATAAGACACTACCCAG ACTTGGTTTGGAAA

AT195	HA_Tag_FOR	ATATGAATACCCATACGATGTTCTGACT ATGC
AT196	HA_Tag_REV	TAAAATACTTAGCTAGAAGCGTAATCTGG AACGTCA
AT197	KlGal1_Term_FOR	TAGCTAAGTATTTTAGGTAATGTTAGTGCT GATTATGATTTGACG
AT198	KlGal1_Term_REV	AAGGGAGAGCGTCGACGATTAGTTCCAAC ACAAATTCGCCAAGG
AT241	ADH1-G80-inFu-FW	TCGGCCGCTCTAGAAGATCCGGGATCGAA GAAAT
AT242	ADH1-G80-inFu-RV	GAAGGGAGTGTCCAGGGTGGTGATTCCTG ACTG
AT243	G80-KR56A-inFu-FW	CTGGACACTCCCTTCCAT
AT244	G80-KR56A-inFu-RV	CCGATTTAAAGATTTAAATGCGCAACAAG TCTTTAA
AT249	KlG80-S2_fw	GAACAAACCATGAAAGTGTTTCATCTAAG G
AT250	KlG80-S2_rv	CCTTAGATGAAACACTTTCATGGTTTGTTT
AT251	KlG80_rv	GCCATAACGGATTCCCGATTTAAAGA
AT253	KlG80NT_15AS_fw	CAAACGCGTAACAATAACAAACGGTCC AAATTATCCACGGTGCCATCGAGTAGACC CATAAGAGTCGGATTCGTCG
AT254	KlG80_KR56A NT15AS_fw	CAAACGCGTAACAATAACGCTGCTTCCA AATTATCCACGGTGCCATCGAGTAGACCC ATAAGAGTCGGATTCGTCG
AT255	KlGal1_mut_FW	ACACTGCCTCATTGATGG
AT256	Gal1_mut_RV	TTGCTGGCGCCTATATCG
A1	Amp_DS	TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA TCTCAGCGAT
K1	Gal80_rw	CGATTCGTTTCGCCTTAAATG
K4	Integration_pIG80_3	CAGCCACAAGAATCTCACCA
K6	Integration_pIG80_5	GGGACAATTGTGATTTAGTC
K8	KlG80_SP1_rv	ATTTAAAGATTTAAATGCGCAA
K22	KlGAL80-1284	GATGCCATCATATTGCACCG
K25	KlGAL80-422C	CTCTTCTGCCTGTTGTACGC
K27	Scgal80_left	TGACTTGGTGCTCGAAGATG
K30	KlGAL80-839C	AGCTGCAAGATACGGGTACC
K31	KlGal80-ATG-rev	GTTATTGTTTCATGATGCCG

K32	PrimerKlGal80rw	TGCTTGCGAACAAGTCATCG
K34	KlGAL80 (-317)	CATTATTCATCGCTCGGACC
K35	pIG80reverse	TGTGAAAGAGAGGACATGGCA
MH3	Bsu36I_fw	AGTGGTCCATAACCTCAGGTTTCAG
MH6	Bpu1102I_rev	GCCAGCTCAGCTATTTATATCATTATTTTC GACA
M13	GAL80.RIGHT	CATGCACGAAAAAGGGAAAT
MH7	XhoI_fw	CGTACTCGAGAACAATAACAAACGGTCC
S2	Gal80_StuI_RV	CCATTTCCAGCAATCTCGAT
S9	ScGal80_P1_FW	TGCCTCTCTTGGAATTCTCC
S10	ScGal80_P2_FW	TGGCAATGTTCCAGTGTCAT
S7	ScG80_SP_1_rv	AATCGGTTACCACGCTCAT
S8	ScG80_SP_2_fw	ATGAGCGTGGTAACCGATT
S23	ScGAL80_+709	CCTCGATGTCCGTTTCCTTA
S27	ScGAL80-179_fw	CATTTACCGGCGCACTCT
S105	ScGAL80-RV+709	CCTCGATGTCCGTTTCCTTA

\* Alle mit AT angegebenen Primer wurden innerhalb dieser Arbeit konstruiert. Alle weiteren Primer waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

### 2.1.7 Lyophilisiertes KlGal4p-AD22-Peptid

Für den Galactokinase-Inhibierungsassay (siehe Abschnitt 2.3.10) wurde KlGal4p-AD22-Peptid (Sequenz: TQQLFNTTMDVYNYIFDNDE, synthetisiert von Genosphere Biotechnologies) verwendet. Zum Lösen des lyophilisierten KlGal4p-AD22-Peptids wurden weniger als 1 mg des Peptids in 10 µl DMF gelöst und 40 µl Gel-filtrationspuffer dazugegeben, so dass eine 20%ige DMF-Lösung entstand. Am NanoPhotometer (Implen) wurde mittels Proteinmessung und nach Eingabe des Molekulargewichts (2687,86 g/mol) und des molaren Extinktionskoeffizienten (2980 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) die Proteinkonzentration ermittelt. Als Blank diente eine 20%ige DMF-Lösung (10 µl DMF + 40 µl Puffer) ohne Peptid. Anhand der gemessenen Absorption bei 280 und 320 nm konnte die Konzentration mittels der Gleichungen (1a und 1b) berechnet werden.

$$c = (\text{Absorption}_{280} - \text{Absorption}_{320}) * A_{280}\text{Faktor} * Lf * Vf \quad (1a)$$

$$A_{280}\text{Faktor} = \frac{\text{MW}}{\text{molarer Extinktionskoeffizient}} \quad (1b)$$

MW = Molekulargewicht

Lf = Lidfaktor, virtueller Verdünnungsfaktor

Vf = Verdünnungsfaktor

Der Lidfaktor gibt einen virtuellen Verdünnungsfaktor an, welcher abhängig vom verwendeten Deckel ist (siehe <http://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/04/NanoPhotometer-P-Class-User-Manual-2.1.pdf>).

## 2.1.8 Enzyme, Standards und Antikörper

### 2.1.8.1 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas und NewEnglandBiolabs bezogen. RNase A, *Pfu*-DNA-Polymerase wurden von Fermentas, Pyruvat-Kinase (727 U/ml) und Laktat-Dehydrogenase (1100 U/ml) von Sigma, *Taq*-DNA-Polymerase (FastStart PCR Master) von Roche und Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase von Finnzymes/Thermo Fisher Scientific bezogen.

### 2.1.8.2 Standards

Für die Agarosegelelektrophorese diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331, Fermentas) für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Prestained Protein Ladder (SM0671, Fermentas) als Standard.

### 2.1.8.3 Antikörper

**Tabelle 2.10** Antikörper

Zielepitop	Spezies	Ig-Klasse	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>			
c-Myc	Maus monoklonal	IgG1 $\kappa$	Roche
c-Myc	Kaninchen polyklonal	IgG	Santa Cruz
HA	Maus monoklonal	IgG2a	Santa Cruz
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Alexa Fluor 555	Ziege Anti-Kaninchen	IgG (H+L)	life technologies
Alexa Fluor 488	Ziege Anti-Maus	IgG (H+L)	life technologies

## 2.1.9 Zentrifugen

Alle Zentrifugationsschritte in 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäßen wurden in einer Eppendorf Centrifuge 5424 bzw. 5417R (Kühlzentrifuge) durchgeführt. Zentrifugationsschritte in 15 ml oder 50 ml Gefäßen wurden in einer Eppendorf Centrifuge 5810R oder einer Beckman Avanti 30 Centrifuge durchgeführt. Größere Volumina wurden in der Beckman Avanti J-25 zentrifugiert.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Transformation von *Escherichia coli*

#### 2.2.1.1 DH5 $\alpha$

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983) und Hanahan *et al.* (1991). 100 ml LB-Medium wurden mit 10 ml einer DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und für mehrere Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C geschüttelt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C und 6000 rpm wurde das Pellet in 0,2 Volumen eiskaltem TFB I (30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid; 10 mM

Calciumchlorid; 50 mM Manganchlorid; 15 % Glycerin; pH 5,8, steril filtriert) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 0,04 Volumen TBF II (10 mM MOPS pH 7, 75 mM Calciumchlorid; 10 mM Rubidiumchlorid; 15 % Glycerin; pH 6,5, steril filtriert) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden als 150 µl Aliquots in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 200–500 ng Plasmid-DNA zu den gefrorenen Zellen des Stamms DH5α gegeben. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und zwischendurch einmal kurz gevortext. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 37 °C für 45 s. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 30-60 min bei 37 °C inkubiert, nach Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsplatten (LB<sup>amp</sup>) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.2 TOP10

Es wurden 2–3 ml φB-Medium (1 Liter: 20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 mM Kaliumchlorid; 4 g Magnesiumsulfat) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 100 ml φB-Medium wurden mit 1 OD-Einheit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,5 wachsen gelassen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, für 5 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 30 ml eiskaltem TFB I (30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid; 10 mM Calciumchlorid; 50 mM Manganchlorid; 15 % Glycerin; pH 5,8, steril filtriert) resuspendiert. Nach 30 min auf Eis wurde die Suspension erneut für 5 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml TFB II (10 mM MOPS pH 7, 75 mM Calciumchlorid; 10 mM Rubidiumchlorid; 15 % Glycerin; pH 6,5, steril filtriert) aufgenommen und für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in 150 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Für die Transformation wurden 2 µl des Mutageneseansatzes (siehe Abschnitt 2.2.12) zu den noch gefrorenen Zellen gegeben. Nach 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Nach einer weiteren Minute auf Eis wurde den Zellen 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C für eine Stunde wurden 10 µl, 100 µl und der restliche Ansatz auf separate Nährmediumsplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

## 2.2.2 Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA

### 2.2.2.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und deren Transformation mit DNA erfolgte nach Akada *et al.* (2000). Eine 2 ml Vorkultur der Hefezellen wurde über Nacht in YEPD-Flüssigmedium angezogen. Mit dieser wurde am folgenden Tag eine 50 ml Hauptkultur von YEPD-Flüssigmedium angeimpft. Nach dem Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6 wurden die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml PLAG-Lösung (40 % PEG 4000; 0,1 M Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 15 % Glycerol (v/v)) resuspendiert. Nach Zugaben von 250  $\mu$ l RNA (10 mg/ml, siehe Abschnitt 2.2.4.5) wurden die Zellen als 200  $\mu$ l Aliquots in einem Reaktionsgefäß schrittweise zunächst bei -20 °C und anschließend bei -70 °C eingefroren.

200–300 ng Plasmid-DNA oder 2–5  $\mu$ g linearisierte DNA wurden zu den noch gefrorenen Hefezellen gegeben. Die Zellen wurden für 1 h schüttelnd bei 37 °C und anschließend 30 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Selektionsplatten ausplattiert.

## 2.2.3 Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte (OD) der Kulturen wurde durch Messung bei 600 nm im Spectrophotometer (Pharmacia LKB-Ultrospec III ) bestimmt.

## 2.2.4 Isolation von Nukleinsäuren

### 2.2.4.1 Isolation chromosomaler DNA aus Hefe

Die Isolation chromosomaler DNA erfolgte nach der Methode von Hoffman und Winston (1987). Die Zellen wurden in 2 ml YEPD-Medium über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Übernachtskultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Zum Pellet wurden 200  $\mu$ l Aufschlusspuffer (2 % TritonX 100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0); 0,3 g (circa 200  $\mu$ l Volumen) Glasperlen (0,4 - 0,6 mm, Sartorius) und 200  $\mu$ l PCA (Phenol : Chlorophorm : Iso-

amylalkohol, 24 : 24 : 1) zugegeben. Nach 3–4 min starkem Vortexen wurden 400 µl TE-Puffer (1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris/HCl pH 8,0) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 14000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 1 ml Ethanol (96 %) erneut für 5 min bei 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurden in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Ein RNase A Verdau erfolgte durch Zugabe von 7 µl RNase A (1 mg/ml) für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl Ammoniumacetat (4 M) und 500 µl Ethanol (96 %) bei Raumtemperatur für 3 min und bei 14000 rpm zentrifugiert und gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.4.2 Schnellisolation chromosomaler DNA aus Hefezellen für Kolonie-PCR**

Die Isolation erfolgte nach (Löoke *et al.*, 2011). Eine Zellkolonie wurde in 100 µl 200 mM Lithiumacetat mit 1 % SDS gelöst. Nach Inkubation bei 70 °C für 5 min wurden der Suspension 300 µl Ethanol (96 %) zugegeben. Nach 3 min Zentrifugation bei 15000 x g wurde das Zellpellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend getrocknet. Darauf wurde das Pellet in 50–100 µl Wasser aufgenommen, kurz für 15 s bei 15000 x g zentrifugiert und 1–2 µl des Überstands für eine PCR eingesetzt.

#### **2.2.4.3 Isolation von Plasmiden aus *E. coli***

Zellen von DH5α, die das zu isolierende Plasmid enthielten, wurden über Nacht in selektivem LB<sup>amp</sup>-Medium angezogen und am nächsten Tag unter Verwendung des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Fermentas) nach den Herstellerangaben isoliert.

#### **2.2.4.4 Isolation von Plasmiden aus Hefe**

Zur Isolation von Plasmiden aus Hefe wurde die Gesamt-DNA wie unter Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben isoliert und anschließend 10 µl der DNA in *E. coli* transformiert.

#### **2.2.4.5 Isolation von RNA aus *E. coli***

Es wurden 5 ml einer DH5α-Vorkultur über Nacht in SOB-Medium (0,5 % Hefeextrakt; 2 % Trypton; 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid; 10 mM MgCl<sub>2</sub>,

10 mM MgSO<sub>4</sub>) bei 37 °C angezogen. 1 Liter SOB-Medium wurde mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 20 ml P1 (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je Reaktionsgefäß wurden 10 ml P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) hinzugegeben, invertiert, 10 ml P3 (2,55 M Kaliumacetat pH 4,8) hinzugegeben, invertiert und bei 10000 rpm für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter gegossen und anschließend mit 1 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt (10000 rpm, 45 min). Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in destilliertem Wasser aufgenommen und eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und aliquotiert.

### 2.2.5 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA wurde mittels NanoPhotometer (Implen) oder SPECTROstar Nano (BMG) durch einfaches Auftropfen von 2–3 µl DNA-Lösung auf die Messsensoren bestimmt.

### 2.2.6 Amplifikation von DNA

Nachweis-PCR-Analysen wurden mit Hilfe einer *Taq*-Polymerase und FastStart PCR-Mix (Roche) durchgeführt. Zu klonierende PCR-Fragmente wurden mittels *Pfu*-Polymerase (Fermentas) amplifiziert. Für besonders große Fragmente (> 5 kb) wurde die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes / Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die verwendeten dNTPs wurden von Fermentas bezogen. Die PCR wurde in einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Bei einer Kolonie-PCR wurde die Probe vor dem ersten Zyklus für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Es erfolgten 42 Zykluswiederholungen.

**Tabelle 2.11** Polymerase-Kettenreaktion mittels *Taq*- und *Pfu*-Polymerase

Temperatur	<i>Taq</i>	<i>Pfu</i>
	10 µl FastStart PCR-Mix (2x)  2 µl je Primer (2 pmol/µl) 1 µl DNA (5–20 ng) H <sub>2</sub> O <i>ad</i> 20 µl	5 µl <i>Pfu</i> -Puffer + MgSO <sub>4</sub> 5 µl dNTPs (je 2 mM) 1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase 5 µl je Primer (2 pmol/µl) 1 µl DNA (5–20 ng) H <sub>2</sub> O <i>ad</i> 50 µl
95 °C	5'	2'
95 °C	30''	1'
55–58 °C	30''	1'
Zyklen	30-35	32
72 °C	1' / 1 kb	2' / 1 kb
72 °C	4'	5'

**Tabelle 2.12** Polymerase-Kettenreaktion mittels Phusion-Polymerase

Temperatur	Phusion
	10 µl Phusion PCR-Mastermix (2x) 2 µl je Primer (2 pmol/µl) 1 µl DNA (5–20 ng) H <sub>2</sub> O <i>ad</i> 20 µl
98 °C	5–10''
58 °C	10–30'' / kb
Zyklen	30
72 °C	10'

### 2.2.7 DNA-Restriktion

Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-Fragmente wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Fermentas) in den vom Hersteller empfohlenen Puffern und bei angegebener optimaler Temperatur geschnitten.

### 2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 0,8 % bzw. 2%igen Agarose-Gelen in 1 x TAE-Puffer (50 x TAE: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) oder 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) aufgetrennt. Zur Detektion der DNA im UV-Licht wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml den

Agarose-Gelen hinzugegeben. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer bzw. 1 x TBE-Puffer. Den DNA Proben wurde 10 x DNA-Ladepuffer (0,21 % Bromphenolblau bzw. 0,21 % Xylencyanol; 50 % Glycerol; 0,2 M EDTA) zugegeben. Als Größenstandard diente Gene Ruler Ladder Mix (SM0331, Fermentas).

### **2.2.9 DNA-Elution aus dem Gel**

DNA-Fragmente wurden mittels QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) oder ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch) den Herstellerangaben folgend aus dem Gel eluiert.

### **2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (Fermentas) und nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.11 Reinigung von DNA-Fragmenten**

PCR-Fragmente oder mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des GeneJET PCR Purification Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

### **2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese**

Ortsgerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Transformation erfolgte in TOP10 Zellen (siehe Abschnitt 2.2.1.2).

### **2.2.13 *Random*-Mutagenese**

An dem *K1GAL1* exprimierenden Plasmid pCAG1 wurde eine PCR mittels *Taq*-Polymerase und den Primern K1Gal1\_mut\_FW und Gal1\_mut\_RV durchgeführt. Es wurden keine weiteren mutagenen Bedingungen gewählt. Allein durch die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase ( $10^{-5}$ ) war hierdurch eine ausreichend hohe Mutageneserate

zu erreichen. Das *SphI*-geschnittene PCR-Produkt wurde anschließend in den ebenso geschnittenen Vektor pCAG1 kloniert. Hierdurch wurde eine Plasmid-Bibliothek mit verschiedenen *KlGal1p*-Varianten erhalten.

### 2.2.14 InFusion Klonierung

Die InFusion Klonierung wurde mittels In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.15 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit (PE Biosystems) verwendet. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 3 µl Terminator-Mix, 4 µl 5x Puffer, 2 µl Primer (2 pmol/µl), 500 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 50–100 ng PCR-Fragment sowie steriles Wasser (*ad* 20 µl) eingesetzt. Das Thermocyclerprogramm war folgendermaßen aufgebaut: 2 min 95 °C [30" 95 °C; 15" 50 °C; 4' 60 °C] x 30. Zur Fällung wurde der Ansatz anschließend mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit 10 µl Natriumacetat (3 M) sowie 250 µl Ethanol (96 %) versetzt und bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet 2 x mit 500 µl frisch angesetztem Ethanol (70 %) für je 5 min gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei RT getrocknet und bei –20 °C bis zur weiteren Analyse durch den hauseigenen Sequenzierservice (Sequenzierer: Applied Biosystems/Hitachi ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer) gelagert.

### 2.2.16 DNA-Fällung

Die zu fällende DNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) und 2,5 Volumen Ethanol (96 %) versetzt und bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend je nach weiterer Verwendung in Puffer gelöst.

### 2.2.17 X-Gal-Plattentest

Eine Einzelkolonie der zu untersuchenden Stämme wurde in 200 µl Wasser resuspendiert. Von dieser Zellsuspension ausgehend wurde eine Verdünnung mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 hergestellt. Diese wurde sukzessive weiter verdünnt ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$ ). Jeweils 3 µl der verschiedenen konzentrierten Zellsuspensionen wurden auf entsprechende Mediumplatten getropft. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert und nach 2–7 Tagen durch Scannen (Epson Perfection V600 Photo) dokumentiert.

### 2.2.18 Wachstumskurve

Zur Messung einer Wachstumskurve wurde von einer Übernachtskultur von Hefezellen in YNB-Medium eine Hauptkultur mit einer OD von 0,2 angeimpft. Die Messung der OD (siehe Abschnitt 2.2.3) zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte über mehrere Tage.

### 2.2.19 Southern-Blot

10 µg der aus Hefe isolierten DNA (siehe Abschnitt 2.2.4.1) wurden über Nacht mit *Nco*I verdaut. Das Enzym wurde hitze-inaktiviert und der Ansatz gefällt. Die DNA wurde auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und das Gel für 3,5 h bei 90 V laufen gelassen. Anschließend folgte die zweimalige Inkubation des Gels in Blot-Lösung I (0,25 M HCl) für je 15 min. Danach wurde das Gel zur Denaturierung der DNA zweimal für 15 min in Blot-Lösung II (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert. Anschließend wurde das Gel für zweimal 30 min in Neutralisierungs-Blot-Lösung III (1 M Ammoniumacetat, 20 mM NaOH) inkubiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurde kurz mit Wasser gewaschen. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (NJ1370, Roche) erfolgte mittels Kapillarblotverfahren. Die DNA wurde am nächsten Morgen für 5 min im Transilluminator (Ultraviolet Cross-linker CL-1000, UVP) durch UV-Licht auf der Membran fixiert.

### Herstellung der DIG-markierten Sonde

Die DIG-markierte Sonde wurde mittels DIG Labeling Mix (Roche) entsprechend der Herstellerangaben per PCR hergestellt. Als Primer dienten K1 und K6 (Tabelle

2.9) und als Template pI80Myc.

### **Hybridisierung**

Die Membran wurde zur Prähybridisierung mit 20 ml Hybridisierungspuffer (5 x SSC; 1 % Blocking Reagenz (Roche); 0,1 % N-Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS) bei 68 °C für 7 h inkubiert. Im Anschluss wurde in Hybridisierungspuffer mit markierter DNA (25 µl markierte DNA und 5 µl DIG-markierte Leiter in 10 ml Puffer), welche 5 min vor Gebrauch aufgekocht wurde, über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit mindestens 50 ml Waschlösung I (2 x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Danach folgten zwei Waschschritte für je 15 min bei 68 °C mit Waschlösung II (0,1 x SSC; 0,1 % SDS).

### **Detektion mittels Chemilumineszenz**

Die Membran wurde für 1 min in Puffer 1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation in 100 ml Puffer 2 (1 % Blockingreagenz (Roche) in Puffer 1) für mindestens 2 h. Daraufhin wurde der Filter für 30 min in 20 ml verdünnter Anti-DIG-AP-Konjugat (Roche, 1:5000 in P2) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 15 min in je 100 ml Puffer 1 mit 0,3 % Tween 20 wurde die Membran für 2 min in 20 ml Puffer 3N (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl) äquilibriert. Die Membran wurde mit einer CSPD-Lösung (15 µl CSPD in 885 µl Puffer 3N) betropft und nach 20 min Inkubation bei 37 °C auf Röntgenfilm exponiert.

### **Detektion mittels Farbreaktion**

Danach konnte die Membran kurz mit Wasser abgespült und in Puffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert werden. Anschließend wurde die Membran im Dunkeln mit 10 ml Farblösung (45 µl NTB-Lösung (100 mg/ml in 70 % DMF) und 35 µl X-Phosphat-Lösung (20 mg/ml in 60 % DMF) in Puffer 3) inkubiert. Sobald deutliche Banden sichtbar waren, wurde die Farblösung abgespült, die Membran getrocknet und durch Scannen dokumentiert.

## 2.2.20 Mikroskopie

### 2.2.20.1 Immunfluoreszenz

Die mikroskopischen Präparate wurden anhand des Protokolls von Audrey L. Atkin (Atkin, 1998) angefertigt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Arbeitskonzentration, Sigma) oder Hoechst 33342 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Arbeitskonzentration, Sigma-Aldrich). Die verwendeten Antikörper sind unter Abschnitt 2.1.8.3 aufgeführt. Die Spheroplastierung der Zellen erfolgte für 10 min bei 30 °C mit 30  $\mu\text{l}$  Zymolyaselösung (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Zymolyase 100T, Seikagaku).

### 2.2.20.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion von GFP-fusionierten Proteinen wurde 1 ml einer logarithmisch gewachsenen Zellkultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10  $\mu$  PBS mit 4 % Formaldehyd resuspendiert. Die Zellen wurden auf mit Polylysin beschichtete Objektträger getropft. Nach 5–10 min wurden die Zellen in PBS abgespült. 10  $\mu$  HOECHST 33342 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 10  $\mu$  Mounting Medium (nach Atkin, 1998) wurden mit einem Deckgläschen auf die Zellen gegeben, diesen angedrückt und mit Nagellack versiegelt.

Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten an einem Zeiss Axioplan 2 mit einer Axio-CamMRc (Filter HOECHST/DAPI: EX G 365, BS FT 395, EM LP 420, GFP/Alexa 488: EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515 und Alexa 555: EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590) oder einem Zeiss LSM 780 AxioObserver mit einem 100x Objektiv alpha Plan-Apochromat. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ImageJ und FigureJ.

Die jeweils abgebildeten Zellen entsprechen der Mehrheit der beobachteten Zellen.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Proteinzellextrakten für Western-Blot-Analysen

15 ml einer Hefezellkultur (YNB mit entsprechenden Kohlenstoffquellen und benötigtem Aminosäure-/Basen-Mix) wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden 5 min bei 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und mit 2 ml

eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Aufschlusspuffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,3; 60 mM Kaliumacetat; 5 mM Magnesiumacetat; 0,05 % TritonX 100 v/v; 10 % Glycerol w/v; 1 mM Natriumfluorid; 20 mM Glycerophosphat; 1 mM DTT; Complete Protease Inhibitor (Roche)) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, in welchem 500 µl Glasperlen (0,4 - 0,6 mm, Sartorius) vorgelegt waren, überführt. Der Ansatz wurde 3 Mal für 3 min bei 4 °C stark gevortext (Multi Pulse Vortexer Glas-Col). Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die aufgeschlossenen Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 10000 rpm bei 4 °C wurde der Zelleextraktüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gewünschte Menge an Proteinextrakt wurde mit 1 × SDS-Protein-Ladepuffer (6x Ladepuffer: 300 mM Tris/HCl pH 6,8; 30 % Glycerin; 12 % SDS; 480 mM DTT; 6 mM EDTA, Bromphenolblau) versetzt und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel für 10 min bei 95 °C erhitzt.

## 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.3.2.1 Bradford-Test

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test (Bio-Rad Protein Assay) in einer 1 ml-Küvette nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nach Zugabe der Bradford-Lösung und 5 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm im Spectrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia) bestimmt und anhand einer BSA-Eichgerade die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.3.2.2 Spektroskopische Proteinkonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe des errechneten molaren Extinktionskoeffizienten wurde die Proteinkonzentration am Nanophotometer (Implen) spektroskopisch gemessen. Die Extinktionskoeffizienten wurden über ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam>) mit den Extinktionskoeffizienten für Tryptophan und Tyrosin nach Pace *et al.* (1995) berechnet.

### 2.3.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte nach der Methode von Lämmli (1970). In einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel (für 2 Gele Trenngel: 3,33 ml Acrylamid; 2,5 ml 4 x Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS); 4,17 ml H<sub>2</sub>O; 20 µl TEMED; 100 µl APS; Sammelgel: 0,67 ml Acrylamid; 1 ml 4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS); 2,33 ml H<sub>2</sub>O; 8 µl TEMED; 40 µl APS) wurden die Proben in Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) für 1 h bei 180 V aufgetrennt.

### 2.3.4 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Das zu färbende Gel wurde über Nacht in Coomassie-Färbelösung (20 % Ethanol; 2 % Phosphorsäure; 10 % Ammoniumsulfat; 0,1 % CoomassieBrillantblau G-250) inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Wasser oder Entfärbelösung (5 % Ethanol; 7,5 % Essigsäure) gewaschen. Die Gele wurden anschließend durch Scannen dokumentiert.

### 2.3.5 Ponceau S Färbung

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der Proteingele und dem gleichmäßigen Transfer auf die PVDF-Membran, wurde die Membran über Nacht in Ponceau-S-Färbelösung (0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure) gelegt.

### 2.3.6 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Millipore Immobilon-P Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Hierzu wurde 1 x Transferpuffer (3 g Tris; 14,4 g Glycin; 20 % Methanol ad 1 Liter H<sub>2</sub>O) verwendet. Der Transfer erfolgte über einen Nass-Blot für 1,5 h bei 100 V und unter Rühren bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h in 30 ml TBSTM (TBST: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween 20; M = 5 % Milchpulver) blockiert. Die Membran wurde daraufhin über Nacht mit im Verhältnis 1:3000 verdünntem, primärem Antikörper inkubiert und anschließend dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

Daraufhin wurde die Membran mit 1:4000 verdünntem, sekundärem Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Waren diese Verdünnungen nicht ausreichend für ein gutes Signal, wurden entsprechend niedrigere Verdünnungen gewählt. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 min mit TBST erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit Hilfe der Amersham ECL Plus bzw. Prime Western Blotting Detektionsreagenzien auf Röntgenfilmen (CEA, Deutschland).

### 2.3.7 Proteinaufreinigung mittels Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie

Zur heterologen Expression der Hefeproteine im *E. coli* Stamm Rosetta(DE3)pLysS wurde dieser mit einem für das gewünschte Protein codierenden pET-Vektor transformiert. Eine Einzelkolonie der Transformation wurde in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 2$  bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die gesamte Vorkultur wurde zu 50 ml antibiotikahaltigem LB-Medium gegeben und bis zu einer  $OD_{600}$  von 2,0 bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. 500 ml Induktionsmedium (Terrific-Broth (TB)-Medium: 1,2 % (w/v) Trypton; 2,4 % (w/v) Hefeextrakt; 0,4 % (v/v) Glycerin; 10 % einer 0,17 M  $KH_2PO_4$  und 0,72 M  $K_2HPO_4$  Stammlösung; 1,5 % Laktose; 100 µg/ml Ampicillin; 35 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit der 50 ml Vorkultur und einer  $OD_{600}$  von 0,2 angeimpft und für 15 h bei 26 °C und 160 rpm (Schüttelinkubator Multitron, Infors) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur für 15 min bei 6600 rpm bei 4 °C (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JLA-10.500, Beckman) zentrifugiert.

#### Zellaufschluss und Reinigung von Gal80p

Das Pellet wurde in 4 °C kaltem Aufschlusspuffer (50 mM Tris; 20 mM NaCitrat; 10 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 8,0 bei RT) resuspendiert und auf Eis gestellt. Der Proteaseinhibitor PMSF wurde mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung zweimal für 1 min (Branson Sonifier S-250A, Duty: 40 %, Output: 4). Das Rohextrakt wurde für 20 min bei 10000 rpm (Avanti 30 Centrifuge, Beckman Coulter) und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung von Nukleinsäuren tropfenweise mit einer 30%igen Streptomycinsulfat-Lösung bis zum Erreichen einer

Endkonzentration von 0,04 % versetzt und für eine Stunde bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 4 °C für 35 min bei 25000 rpm (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA 25.50, Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert.

### **Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung des Proteinextrakts erfolgte zunächst mit Hilfe der ÄKTApurifier (GE Healthcare) durch Affinitätschromatographie über eine HisPrep FF16/60-Säule (Ni<sup>2+</sup>-NTA Sepharose, GE Healthcare). Ein pH-Wert von 8,0 der Proteinlösung wurde überprüft. Die Proteinlösung wurde mittels Superloop (GE Healthcare) mit 2 ml/min auf die mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Säule überführt. Diese wurde anschließend mit drei Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris; 20 mM NaCitrat; 10 mM NaCl; 40 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 8,0 bei RT; Flussrate 1 ml/min) gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer ((50 mM Tris; 20 mM NaCitrat; 10 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 8,0 bei RT; Flussrate 1 ml/min). 2 ml-Fraktionen wurden automatisch gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurden vereint. Die erhaltene Proteinlösung wurde anschließend durch Gelfiltration weiter aufgereinigt.

### **Gelfiltration**

Die Gelfiltration erfolgte mit einer HighLoad 16/60 Superdex 200pg-Säule und der ÄKTApurifier (GE Healthcare). Nach Äquilibrierung der Säule mit Laufpuffer (20 mM Tris; 60 mM NaCl; 60 mM EDTA, pH 8,2 bei RT) wurden bis zu 5 ml der Proteinlösung aus der Affinitätschromatographie mittels Superloop aufgetragen. Nach dem Lauf über die Säule wurden 2 ml-Fraktionen gesammelt und im SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration des zu reinigenden Proteins wurden vereint, mit Glycerin (Endkonzentration 20 % v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

### **2.3.8 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen**

Vor analytischen Messungen erfolgte ein Pufferwechsel, der in 20 % Glycerol bei -70 °C gelagerten Proteinlösungen. Hierzu wurden Amicon Ultra Centrifugal Fil-

ter Devices 30000 MWCO (Millipore) verwendet. Die Proben wurden bei 4 °C und 2700 x g zentrifugiert.

### 2.3.9 $\beta$ -Galactosidase-Assay

#### Anzucht der Stämme

Ausgehend von einer 8 Stunden bei 30 °C geschüttelten 4 ml Vorkultur (YNB, 2 % Glucose) wurde eine 50 ml Vorkultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,01 angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Abend wurde mit dieser Vorkultur eine 200 ml Hauptkultur mit der  $OD_{600}$  von 0,005 angeimpft, so dass die Kulturen am nächsten morgen noch in der logarithmischen Wachstumsphase waren, und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Diese Kultur wurde auf YNB mit 2 % Galactose geshiftet und eine  $OD_{600}$  von 0,5 eingestellt. Nach 2, 4 und 8 Stunden wurden 50 ml Kultur geerntet. Als Zeitpunkt null wurden 20 OD-Einheiten der Glucose-Hauptkultur geerntet. Die Zellen wurden pelletiert, in 5 ml  $\beta$ -Gal-Puffer (5 mM Tris pH 7,8; 5 % (v/v) Glycerin; 10 mM KCl) gewaschen und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

#### Isolation der Proteinextrakte

Am Tag der Messung wurden die Zellpellets in 500  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Puffer gelöst und mit 700  $\mu$ l Glasperlen (0,4 - 0,6 mm, Sartorius) für 3 x 3 min bei 4 °C stark gevortext. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 10000 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration im Bradford-Assay bestimmt.

#### Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Der  $\beta$ -Galactosidase-Assay basiert auf der Methode von Miller (1972). Die Messung erfolgte in Greiner F-Bottom 96-Well-Platten. Hierzu wurden 5, 10 und 20  $\mu$ l der Proteinextrakte oder deren Verdünnungen in die Wells vorgelegt und mit  $\beta$ -Gal-Puffer auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Hierzu wurden 200  $\mu$ l auf 30 °C vorgewärmte *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid-Lösung (ONPG) (4 mg/ml in  $\beta$ -Gal-Puffer) zugegeben und im SPECTROstar Nano (BMG) bei 30 °C die Absorption bei 420 nm über 3 min alle 30 s gemessen. Als Referenz diente die ONPG-Lösung allein. Die Proteinver-

dünnungen wurden so gewählt, dass der Absorptionsanstieg im linearen Bereich lag. Zur Auswertung wurden außerdem nur Werte im linearen Bereich verwendet. Für jedes Volumen wurden vier technische Replikate gemessen. Die Berechnung der spezifischen  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (mU / mg) – bezogen auf die Gesamtproteinmenge im Rohextrakt – erfolgte nach Gleichung 2. Der Extinktionskoeffizient von *o*-Nitrophenol beträgt  $0,0045 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Miller, 1972). Die Korrektur für die Schichtdicke, die durch die verkürzte Schichtdicke der Mikrotiterplatte nötig ist, wurde mittels SPECTROstar Nano Software durchgeführt.

$$\text{spezifische Aktivität}_{\beta\text{-Gal}} = \frac{\Delta A_{420} * V_G * VF}{\varepsilon * V_P * c * d} \quad (2)$$

$\Delta A_{420}$  = Abnahme der Absorption bei 420 nm pro min

VF = Verdünnungsfaktor

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient von *o*-Nitrophenol

$V_G$  = Gesamtvolumen

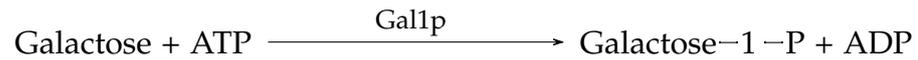
$V_P$  = Volumen an Proteinextrakt

$c$  = Konzentration des Rohextrakts

$d$  = Schichtdicke

### 2.3.10 Galactokinase-Inhibierungsassay

Die Messung der relativen Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* erfolgte durch einen gekoppelten, enzymatischen Test (Anders *et al.*, 2006). Durch die Phosphorylierung von Galactose durch *KlGal1p* wird ATP verbraucht. Das entstandene ADP wird zusammen mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Die Lactatdehydrogenase führt zur Umsetzung von Pyruvat zu Lactat. Mit diesem Schritt geht ein Verbrauch von NADH einher. NADH zeigt im nahen ultravioletten Licht ein Extinktionsmaximum bei 340 nm. Dadurch lässt sich die reduzierte (NADH) Form von der oxidierten (NAD) Form photometrisch unterscheiden. Hierbei handelt es sich um einen zusammengesetzten optischen Test nach O. Warburg.



Der benötigte Messpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10 mM Kaliumchlorid; 5 mM Magnesiumchlorid; 300 µg/ml BSA; 1 mM Fruktose-1,6-bisphosphat; 0,25 mM NADH; 2 mM Phosphoenolpyruvat; 1 mM ATP; 8 bzw. 12 U/ml der Enzyme Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase) wurde am Tag des Experiments frisch hergestellt. Für Messungen unter Hochsalzbedingungen wurden dem Puffer 100 mM Kaliumacetat zugefügt. Der Puffer wurde vor Gebrauch auf 30 °C erwärmt. Zu der benötigten Menge Puffer wurden 10 nM aufgereinigtes *KlGal1p* (mit N-terminalem His(6x)-Epitop, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Constance Zugowski (Zugowski, 2013)) hinzugegeben.

Zur Untersuchung der Affinität verschiedener *KlGal80p*-Varianten zu *KlGal1p* (10 nM im Messansatz) wurde den entsprechenden Ansätzen *KlGal80p* (380 nM) zugegeben. Um zusätzlich den Einfluss von *KlGal4p* auf die *KlGal80p-KlGal1p*-Interaktion zu untersuchen, enthielten diese Ansätze das *KlGal4p-AD22*-Peptid (1,3 oder 2,6 µM, Genosphere Biotechnologies). *KlGal80p* lag in Puffer (20 mM Tris pH 8,2; 60 mM NaCl; 60 mM EDTA) vor. Das *KlGal4p-AD22*-Peptid wurde wie unter Abschnitt 2.1.7 beschrieben gelöst. Um den Einfluss von NADP auf die *KlGal1p-KlGal80p*-Interaktion zu untersuchen, enthielten die entsprechenden Ansätze 1 mM NADP im Puffer.

Die Ansätze enthielten gleiche Volumina an Messpuffer mit *KlGal1p*. Die unterschiedlichen Volumina der *KlGal80p*-Lösungen und des *KlGal4p-AD22*-Peptids wurden mit Puffer (20 mM Tris pH 8,2; 60 mM NaCl; 60 mM EDTA) ausgeglichen. Es wurden je 285 µl des Ansatzes in vier Wells einer 96-Wellplatte (Greiner 96 Well Microplate/F-bottom) pipettiert. Daraufhin wurden mittels einer Mehrkanalpipette 15 µl einer 1 M Galactoselösung zu den Wells pipettiert. Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und sofort in einem Spektrophotometer (SPECTROstar nano, BMG Labtech) bei 30 °C gemessen. Die Absorptionsabnahme bei 340 nm zeigte die NADH Abnahme an und wurde über 5 min gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels MARS Data Analysis Software sowie SigmaPlot 12.5.

Zur Bestimmung der Extinktionsabnahme ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) wurde nur der Messbereich genutzt, in welchem die Abnahme linear erfolgte. Die relative Aktivität wurde in Bezug auf jene Messung ermittelt, welche ausschließlich *KlGal1p* und kein weiteres Protein enthielt.

Die Abnahme der Extinktion ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ), die Konzentration von *KlGal1p* ( $[\text{Gal1p}]$  in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) im Ansatz sowie der Extinktionskoeffizient von NADH ( $6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) dienten zur Berechnung der relativen Galactokinaseaktivität. Die verkürzte Schichtdicke der Wells wurde bereits durch die Software des SPECTROstar nano auf eine Schichtdicke von 1 cm umgerechnet. Durch Heranziehen der Gesamtkonzentration von *KlGal1p* im Reaktionsansatz konnte die Gleichung zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität (3b) vereinfacht werden (3c)

$$\text{Enzymaktivität } A = \frac{\Delta A_{340} * V}{(d * \varepsilon * V_{\text{Gal1}})} \quad (3a)$$

$$\text{spezifische Enzymaktivität } A_S = \frac{\Delta A_{340} * V}{(d * \varepsilon * V_{\text{Gal1}} * [\text{Gal1}]_L)} \quad (3b)$$

$$\text{spezifische Enzymaktivität } A_S = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{([\text{Gal1}]_G * 6,3 * 10^3)} * 10^6 \quad (3c)$$

$$[A_S] = \text{U}/\text{mg}$$

$\Delta A_{340}$  = Abnahme der Extinktion bei 340 nm

$V$  = Volumen des Reaktionsansatzes

$V_{\text{Gal1}}$  = Volumen der eingesetzten Gal1p-Lösung

$d$  = Schichtdicke der Küvette

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

$[\text{Gal1}]_L$  = Konzentration der eingesetzten Gal1p-Lösung

$[\text{Gal1}]_G$  = Konzentration an Gal1p im gesamten Reaktionsansatz

Die gemessene, spezifische Enzymaktivität wurde anschließend in Relation zur Enzymaktivität in Abwesenheit von *KlGal80p* gesetzt und so die relative Galactokinaseaktivität erhalten.

Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante wurde die Abnahme der relativen Galactokinaseaktivität bei steigender Konzentration der *KlGal80p*-Varianten gemessen. Hierzu wurden Wildtyp-*KlGal80p* und *KlGal80p*-W31F bis 600 nM, *KlGal80p*-K5A/R6A bis 2,3  $\mu\text{M}$  bzw. 12  $\mu\text{M}$  titriert. Anhand der relativen Galac-

kinaseaktivitäten konnte mittels der in der Doktorarbeit von Alexander Anders (2006) hergeleiteten Formel (4) die apparente Dissoziationskonstante ( $K_{D, \text{app}}$ ) in SigmaPlot 12.0 berechnet werden.

$$\text{relative Enzymaktivität} = \frac{k_1 * [KlGal80]_T + K_{D, \text{app}}}{K_{D, \text{app}} + [KlGal80]_T} \quad (4)$$

$[KlGal80]_T$  = Gesamtkonzentration an KlGal80p

$K_{D, \text{app}}$  = apparente Dissoziationskonstante

$k_1$  = Aktivität von KlGal1p im KlGal80p-KlGal1p-Komplex

## 2.4 Biophysikalische Methoden

### 2.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen erfolgten wie bei Blüher *et al.* (2014) beschrieben. Es wurden jeweils 1  $\mu\text{M}$  aufgereinigtes (Abschnitt 2.3.7) NHKlGal80p oder NHKlGal80p-K5A/R6A eingesetzt. Die mit 20 % Glycerol versetzten Proteinlösungen wurden kurz vor dem Experiment aufgetaut. Mittels eines Amicon Ultra Filters (siehe Abschnitt 2.3.8) wurde die Glycerolkonzentration auf unter 0,002 % reduziert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (siehe Abschnitt 2.3.2) bestimmt. NADP wurde in Fluoreszenzpuffer (20 mM Tris pH 8.2 bei RT, 60 mM Natriumchlorid, 60 mM EDTA) gelöst und schrittweise zum Ansatz hinzu titriert. Nach Zugabe von NADP und Mischen durch Pipettieren wurde der Ansatz vor der Messung noch 5 min bei 20 °C inkubiert.

Die Messung wurde mit einem auf 20 °C temperierten JASCO FP-6500 Spectrofluorometer (JASCO Labor- und Datentechnik) und der Software Spectra Manager durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und das Emissionsspektrum wurde von 305 bis 380 nm in 0,5 nm Schritten und einer Spaltbreite von 5 nm detektiert. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min. Jeweils drei Messungen wurden gemittelt. Es wurde eine Halbmikro-Fluoreszenzküvette (104F-QS von Hellma Analytics) verwendet. Die Messdaten wurden für Verdünnungseffekte sowie Spektren von Puffer und NADP allein korrigiert.

Die Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der NADP-Konzentration wird durch statisches Quenchen verursacht und dient als Maß für die Affinität von *KlGal80p* für NADP. Die maximalen Fluoreszenzintensitäten wurden für die Berechnung herangezogen. Die Quenchkonstante wurde basierend auf den durch Doreen Blüher (geb. Schmidt) (Schmidt, 2010) durchgeführten Messungen mit dem Tryptophan-Analogon N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA) berechnet. Quenchkonstante und apparente Dissoziationskonstante  $K_{D, app}$  wurden anhand der in Blüher *et al.* (2014) angegebenen Gleichungen berechnet.

### 2.4.2 Nah-UV-VIS-CD-Spektroskopie

NH*KlGal80p* sowie die Varianten lagen in Puffer (20 mM Tris, 60 mM NaCl; 60 mM EDTA; pH 8,2) vor und wurden mit einer Konzentration von 88  $\mu\text{M}$  (Wildtyp) bzw. 120  $\mu\text{M}$  (Varianten) im Messansatz analysiert. Um die Fähigkeit zur Dinukleotidbindung zu messen, wurde zu NH*KlGal80p* und dessen mutierten Varianten NADP, welches im selben Puffer vorlag, hinzutitriert. Nach 5 min Inkubationszeit erfolgte die Messung.

Die Messungen erfolgten an einem JASCO J-815 CD Spectrometer (JASCO Labor- und Datentechnik) in einer 1 cm-Küvette (Helma). Die Spektren wurden zwischen 500 und 290 nm gemessen, mit einer Schrittweite von 1 nm, einer Messgeschwindigkeit von 200 nm/min, im kontinuierlichen Scanmodus bei 20 °C. Es wurden 12 Einzelspektren gemittelt. Die erhaltenen Spektren wurden für Verdünnungseffekte sowie für Puffer- und NADP-Spektren korrigiert. Die gemessene Elliptizität wurde anhand von Gleichung (5) zur Berechnung der molaren Elliptizität herangezogen.

$$\Theta_{molar} = \frac{\Theta_{obs} * 100 * M_r}{c * l} \quad (5)$$

$\Theta_{molar}$  = molare Elliptizität in  $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$

$\Theta_{obs}$  = gemessene Elliptizität in mdeg

$M_r$  = apparente Molekülmasse des Proteins in Da

$l$  = optische Weglänge in cm

$c$  = Proteinkonzentration in mg/ml

# 3 ERGEBNISSE

---

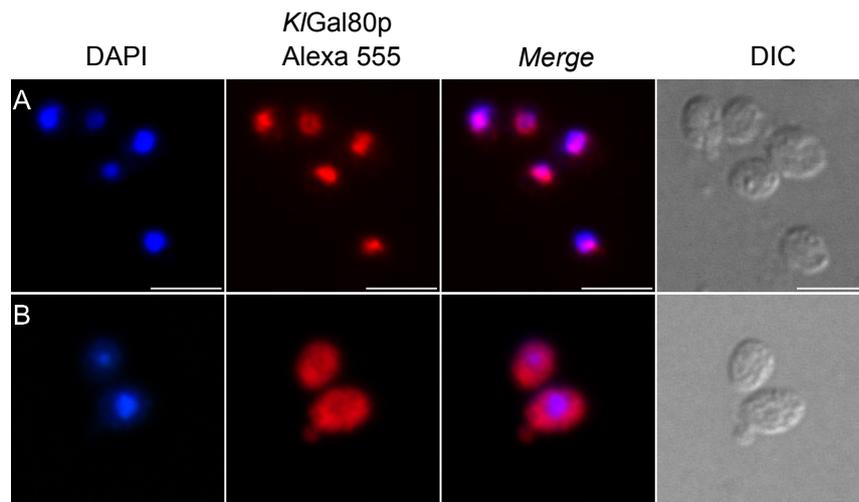
Die unterschiedliche Lokalisation von *KlGal80p* (Kern) und *ScGal80p* (gesamte Zelle) ist ein zentraler Unterschied des *GAL*-Schalters in *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis*. Da für *S. cerevisiae* die Rolle der Lokalisation von *ScGal80p* als Teil des Induktionsmechanismus kontrovers diskutiert wurde (siehe Abschnitt 1.4), war es von Interesse zu klären, was die Ursache für die unterschiedliche Lokalisation ist und wie sich eine veränderte Lokalisation des Repressors in *K. lactis* in Bezug auf die Repression und Induktion äußert.

## 3.1 Analysen zu Kernlokalisierungssignalen in *Sc*- und *KlGal80p*

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Tews, 2009) habe ich nach der Kernlokalisationssequenz in *KlGal80p* gesucht und konnte Hinweise dafür finden, dass diese N-terminal liegt. N-terminale *KlGal80p*-Fragmente, darunter das kleinste *KlGal80p*-C1 (Aminosäuren 2-39), zeigten als GFP-Fusionsprotein noch eine Kernlokalisierung und der Aminosäureaustausch K5A R6A im N-Terminus von *KlGal80p* führt zu einer Störung der Kernlokalisierung des GFP-Fusionsproteins.

Die Lokalisation von *KlGal80p* wurde zunächst über von einem Multikopieplasmid exprimiertes, GFP-fusioniertes *KlGal80p* untersucht (Tews, 2009). Um auszuschließen, dass die N-terminale GFP-Fusion sowie die Überexpression einen Einfluss auf die Lokalisation der *KlGal80p*-Variante hatte, wurden zunächst stabile Stämme konstruiert, in die Wildtyp-*KlGAL80* bzw. *Klgal80*-K5A/R6A mit C-terminalem c-Myc-Epitop jedoch ohne GFP integriert wurden. Da die Konstruktion durch *Random-Integration* eines Integrationsplasmids mit *URA3*-Selektionsmarker zu einem instabilen Phänotyp (wiederholte Aufspaltung in weiße und blaue Kolonien auf 2 % Galactose beim X-Gal-Plattentest) führte, wurden die Gene daraufhin über *gene replacement* gezielt am *KlGAL80*-Locus integriert (siehe Abschnitt 2.1.3). Durch Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 2.2.20.1) konnten die Proteine über das C-terminale c-Myc-Epitop detektiert werden.

Wie Abbildung 3.1 zeigt, ist auch bei chromosomal integriertem (*Klgal80*-K5A/R6A)



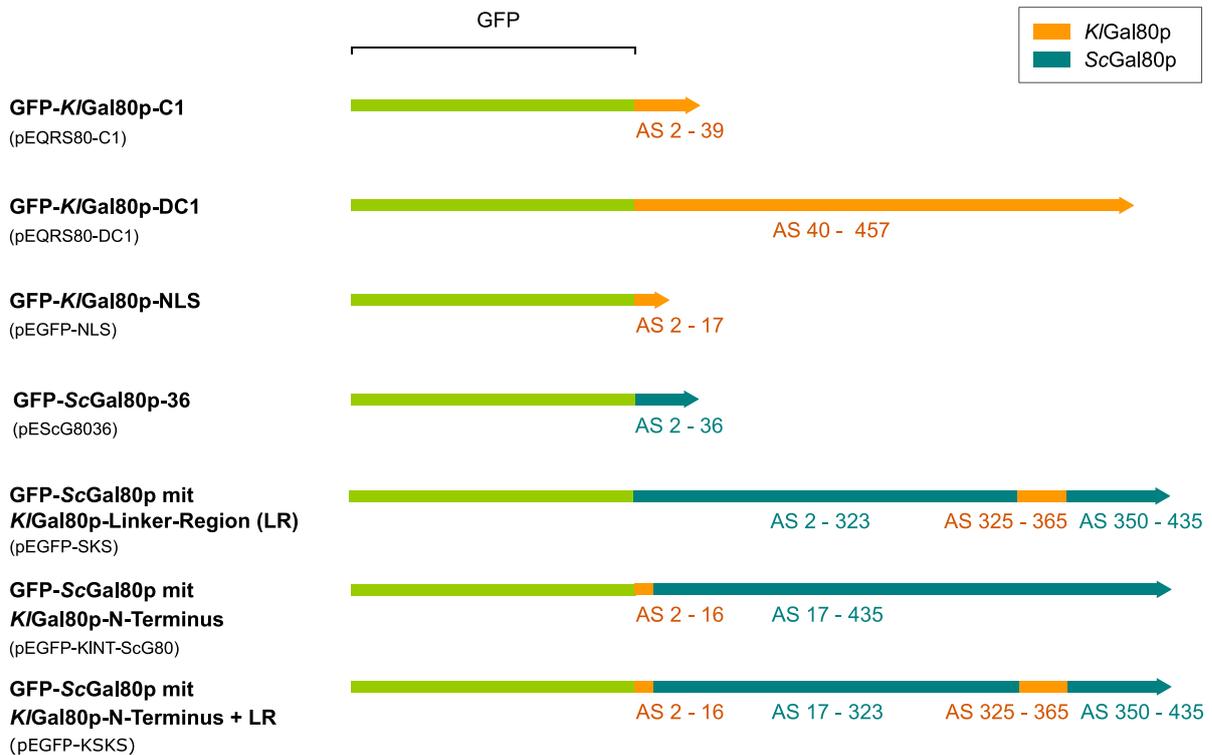
**Abbildung 3.1 Untersuchung der Lokalisation von *KlGal80p*-K5A/R6A durch Immunfluoreszenzmikroskopie.** **A** Die Stämme JA6/G80M (Wildtyp-*KlGal80p* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) und **B** JA6/G80-KR56A (*KlGal80p*-K5A/R6A mit C-terminalem c-Myc-Epitop) wurden in Minimalmedium mit 2 % Galactose angezogen und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Kern wurde mit DAPI angefärbt. Mit c-Myc-Epitop fusioniertes *KlGal80p* wurde über einen primären c-Myc-Antikörper und einen sekundären Alexa 555 Antikörper detektiert. *Merge*: überlagerte Kanäle. *DIC*: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

eine Beeinträchtigung des Kerntransports von *KlGal80p*-K5A/R6A zu beobachten. Statt ausschließlich im Kern ist *KlGal80p*-K5A/R6A in der gesamten Zelle verteilt. Ein Kernausschluss ist hingegen nicht zu beobachten.

Um die Funktion des N-Terminus für die Kernlokalisierung weiter zu bestätigen, wurden weitere *KlGal80p*-Varianten als GFP-Fusionsproteine konstruiert (Übersicht: Abbildung 3.2) und mikroskopisch untersucht. In einem Teil der Zellen waren GFP-Aggregate zu beobachten. Dies ist ein bekanntes Phänomen bei der Überexpression von GFP-Fusionsproteinen (Day und Davidson, 2009). Diese Zellen wurden für die Beurteilung der Lokalisation nicht mit einbezogen. Die GFP-Fusionsproteine wurden mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

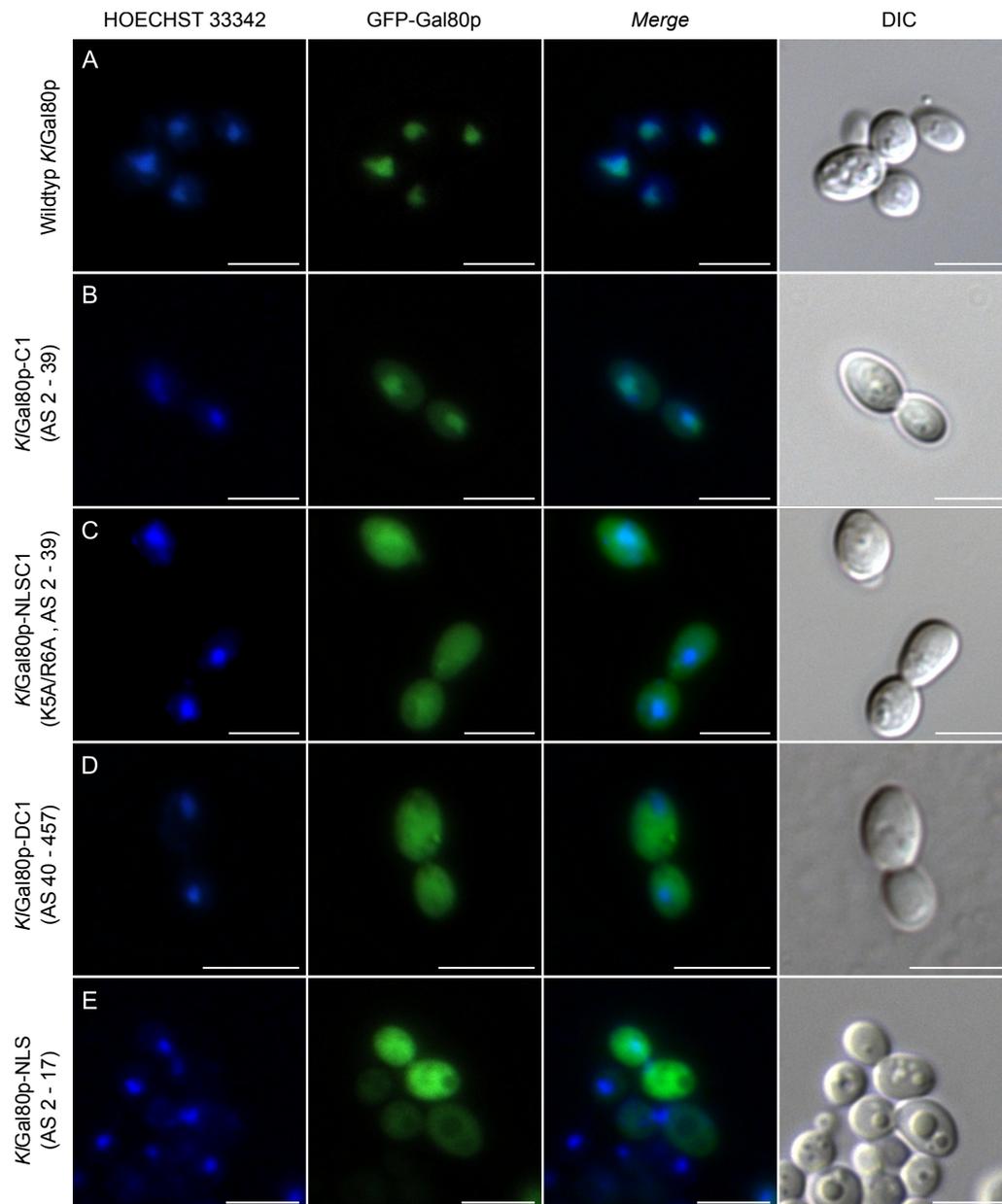
Wie bereits zuvor gezeigt, ist die von einem Multikopieplasmid exprimierte GFP-*KlGal80p*-Fusion im Kern lokalisiert (Abbildung 3.3A). Es zeigte sich hierbei kein Unterschied, ob eine C-terminale (pEG80WTGFPct) oder N-terminale GFP-Fusion (pEQRS80) vorlag (Tews, 2009). Eine GFP-Fusion mit einem *KlGal80p*-Fragment der N-terminalen 39 Aminosäuren ist ebenfalls im Kern, wenn auch nicht mehr ausschließlich dort, lokalisiert (Abbildung 3.3B). Entfernt man die N-terminalen 39 Aminosäuren, so ist *KlGal80p* nicht mehr kernlokalisiert (Abbildung 3.3D). Hier

wurde nun zusätzlich der Aminosäureaustausch K5A R6A in das *KlGal80p*-Fragment (Aminosäure 2-39) eingefügt. Dies stört, wie auch in der *KlGal80p*-Volllängenvariante, den Kerntransport dieser Variante (3.3C). Die N-terminalen 17 Aminosäuren reichten hingegen nicht aus, um GFP in den Kern zu transportieren (Abbildung 3.3E).



**Abbildung 3.2 Schematische Übersicht über die GFP-Fusionsproteine.** Schematisch dargestellt ist die Proteinsequenz der plasmidkodierte GFP-Fusionsproteine. Die Proteine wurden unter Kontrolle eines *ADH1*-Promotors exprimiert.

Für *ScGal80p* sind zwei NLS beschrieben, eine ebenfalls N-terminal gelegene (Aminosäure 1 bis 109) und eine C-terminale (Aminosäure 342 bis 405) (Nogi und Fukasawa, 1989). Beide Gal80p-Homologe sind zu einem großen Teil konserviert. Jene Region, welche am wenigsten konserviert ist, wird als Linker-Region bezeichnet (Aminosäuren 325 bis 365 von *KlGAL80* und 324 bis 349 von *ScGAL80*, Zenke *et al.*, 1993). Diese Region überlappt zum Teil mit der postulierten zweiten NLS in *ScGal80p*. In einer vorangegangenen Arbeit (Hager, 2003) wurde die Linker-Region in *KlGal80p* gegen jene aus *ScGal80p* ausgetauscht, was zu einer in der Kernlokalisation gestörten *KlGal80p*-Variante führte (Hager, 2003). Dies widerspricht einer NLS in der Linker-Region von *ScGal80p* und könnte eher auf eine NLS in der Linker-



**Abbildung 3.3 Der Einfluss des N-Terminus von *K/Gal80p* auf die Lokalisation.** (A) Die für GFP-Fusionsproteine kodierenden Plasmide pEG80WTGFPct (Wildtyp-*K/Gal80p*), (B) pEQRS80C1 (*K/Gal80p*-Fragment AS 2-39), (C) pEgal80NLS1C1 ((*K/Gal80p*-Fragment AS 2-39 mit Austausch K5A R6A)), (D) pEQRS80DC1 (*K/Gal80p*-Fragment ohne Aminosäure 2-39) und (E) pEGFPNLS ((*K/Gal80p*-Fragment AS 2-17) wurden in den *gal80*-Deletionsstamm JA6/D802R transformiert. Die Zellen wurden in selektivem Minimalmedium mit 2 % Glucose angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Kern wurde mit Hoechst angefärbt. *Merge*: überlagerte Kanäle. *DIC*: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

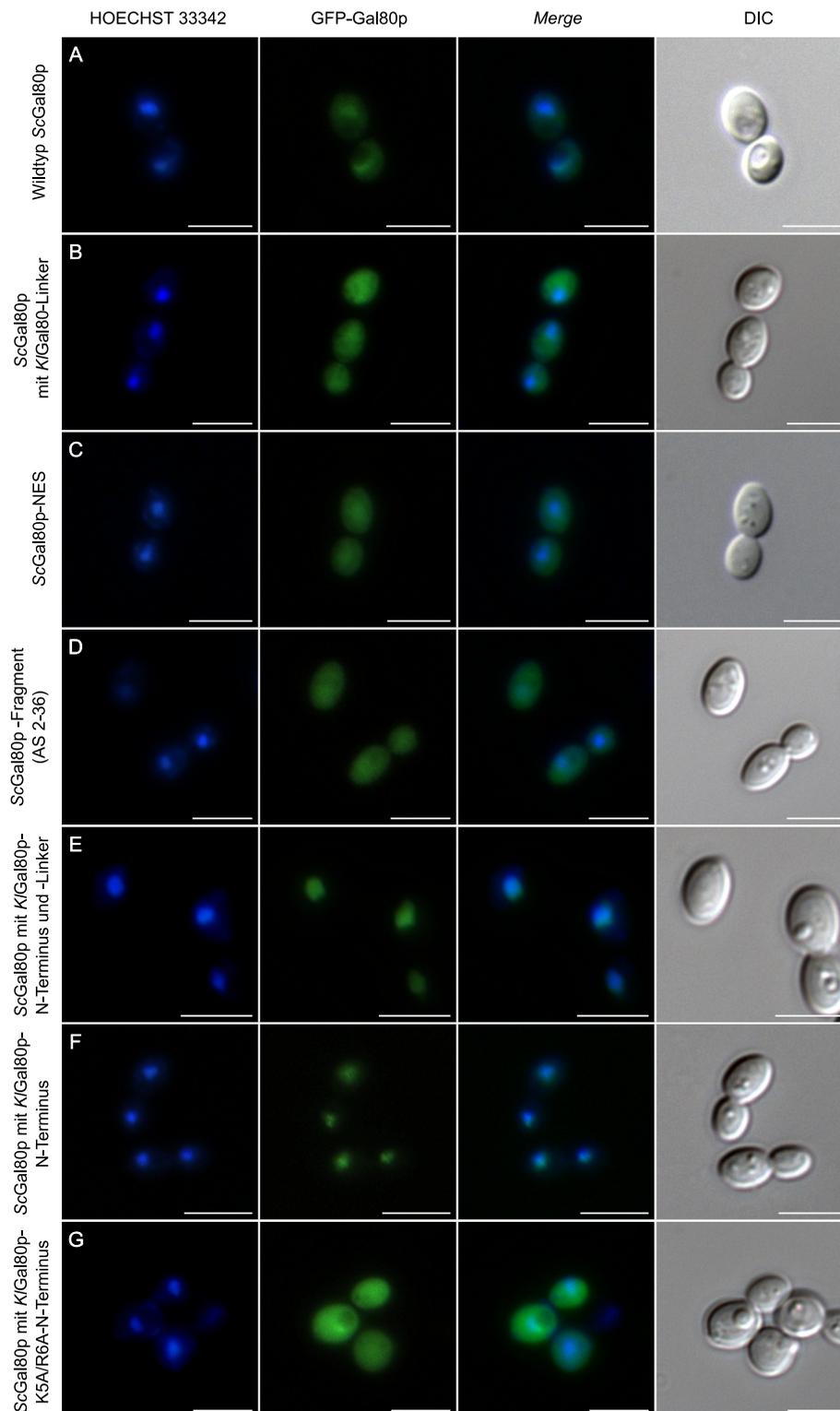
Region von *K/Gal80p* oder eine NES in der Linker-Region von *ScGal80p* hindeuten. Zur Klärung dieser Frage wurde in dieser Arbeit die reziproke *Gal80p*-Variante, also eine *ScGal80p*-Variante mit *K/Gal80p*-Linker-Region, konstruiert und in einen

*K. lactis gal80*-Deletionsstamm transformiert. Da die Lokalisation von ScGal80p und KlGal80p nicht speziesabhängig ist (Anders *et al.*, 2006), konnte die Lokalisation dieser Variante auch in *K. lactis* beurteilt werden.

Die ScGal80p-Variante mit KlGal80p-Linker-Region war in der gesamten Zelle lokalisiert (Abbildung 3.4B). Dies zeigt folgendes: Wenn eine NLS in der Linker-Region von KlGal80p liegt, ist diese nicht ausreichend, um ScGal80p, wie KlGal80p, ausschließlich im Kern zu lokalisieren.

Um zu prüfen, ob eine NES in ScGal80p dafür verantwortlich ist, dass das Protein nicht ausschließlich im Kern lokalisiert ist, wurde nach einer putativen NES in ScGal80p gesucht. Sowohl NetNES als auch ValidNESs sagen für ScGal80p eine NES voraus (<sub>402</sub>LMDALILHRLI<sub>412</sub> bzw. <sub>402</sub>LMDALIL<sub>408</sub>), welche außerhalb der Linker-Region liegt. Diese leucinreiche Sequenz ähnelt der NES-Consensus-Sequenz Lx(1–3)Lx(2–4)LxL(V/I/M) (La Cour *et al.*, 2003). Zwei der Leucine innerhalb dieser Sequenz wurden innerhalb dieser Arbeit mutiert (L402A, L406A). Die resultierende Variante ScGal80p-NES war weiterhin in der gesamten Zelle lokalisiert (Abbildung 3.4C), auf Glucose war wie beim Wildtyp eine leichte Anreicherung im Kern zu beobachten. Dieser Phänotyp konnte auch in *S. cerevisiae* bestätigt werden. Hierfür wurden ein Wildtyp-ScGal80p bzw. die ScGal80p-Variante (Aminosäureaustausch L402A L406A) exprimierendes Multikopieplasmid (YEScG80, YEScG80NES) in den *gal80*-Deletionsstamm I4 *gal80::his* transformiert. Die Mutation der putativen NES führte auch hier nicht zu einer stärkeren Kernakkumulation von ScGal80p (Daten nicht gezeigt).

Da auch für ScGal80p eine N-terminale NLS beschrieben ist (Nogi und Fukasawa, 1989), wurde eine verkürzte ScGal80p-Variante, bestehend aus Aminosäure 2 bis 36, mit GFP-Fusion konstruiert. Diese Variante enthält die zu KlGal80p-C1, dem kleinsten Fragment von KlGal80p, welches noch Kernlokalisierung zeigte (Abbildung 3.3B), korrespondierenden Aminosäuren. Dieses ScGal80p-Fragment zeigte keine Kernlokalisierung (Abbildung 3.4D). Dies deutet darauf hin, dass der Unterschied für die unterschiedliche Lokalisation beider Proteine im N-Terminus zu finden ist. Daher wurden in der ScGal80p-Variante mit KlGal80p-Linker-Region zusätzlich die 16 N-terminalen Aminosäuren gegen jene aus KlGal80p ausgetauscht (pEGFP-KSKS). Tatsächlich war diese Variante nun ausschließlich im Kern lokalisiert (Abbildung 3.4E), so wie es auch für Wildtyp-KlGal80p der Fall ist.



**Abbildung 3.4** Untersuchung der für den Lokalisationsunterschied von *KlGal80p* und *ScGal80p* verantwortlichen Domäne. Die Plasmide (A) pEScG80, (B) pEGFPSKS (*ScGal80p* mit *KlGal80p*-Linker-Region), (C) pEScG80NES (Aminosäureaustausch L402A, L406A), (D) pEScG8036 (*ScGal80p*-Fragment AS 2 - 36), (E) pEGFP-KSKS (*ScGal80p* mit *KlGal80p*-Linker-Region und -N-Terminus) (F) pEGFP-KINT-ScG80 (*ScGal80p* mit *KlGal80p*-N-Terminus), (G) pEGFP-KI56-ScG80 (*ScGal80p* mit *KlGal80p*-N-Terminus und Austausch K5A R6A) wurden in JA6/D802R transformiert. Die Zellen wurden in selektivem Minimalmedium mit 2 % Glucose angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Kern wurde mit Hoechst angefärbt. *Merge*: überlagerte Kanäle. DIC: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

Um zu bestätigen, dass nur die N-terminalen Aminosäuren hierfür nötig sind, wurde eine *ScGal80p*-Variante konstruiert, bei der ausschließlich die N-terminalen 16 Aminosäuren gegen jene aus *KlGal80p* ausgetauscht waren (Plasmid: pEGFP-KINT-*ScG80*). Diese war ebenfalls kernlokalisiert (Abbildung 3.4F). Der Austausch K5A/R6A in dieser Variante (pEGFP-KI56-*ScG80*) führte wie bei *KlGal80p*-K5A/R6A zum Verlust der ausschließlichen Kernlokalisation (Abbildung 3.4G).

Der Austausch der N-terminalen 16 Aminosäuren allein war ausreichend, um *ScGal80p* überwiegend im Zellkern zu detektieren, jedoch wies die *ScGal80p*-Variante mit *KlGal80p*-N-Terminus und der Linker-Region ein stärkeres GFP-Signal auf. Auffällig war, dass die Zellen, welche die *ScGal80p*-Varianten mit *KlGal80p*-N-Terminus mit und ohne K5A/R6A-Austausch (pEGFP-KINT-*ScG80* bzw. pEGFP-KI56-*ScG80*) exprimierten, schlechter wuchsen und deutlich weniger Zellen leuchteten als bei den anderen Konstrukten. In der Western-Blot-Analyse deutete nichts auf einen schnelleren Abbau dieser Varianten hin, weshalb davon auszugehen ist, dass die Überexpression dieser *ScGal80p*-Varianten für das schlechte Wachstum verantwortlich ist und dadurch ein Selektionsdruck entsteht, der plasmidlose Zellen anreichert. Für die *ScGal80p*-Variante mit *KlGal80p*-N-Terminus und -Linker-Region konnte dies nicht beobachtet werden.

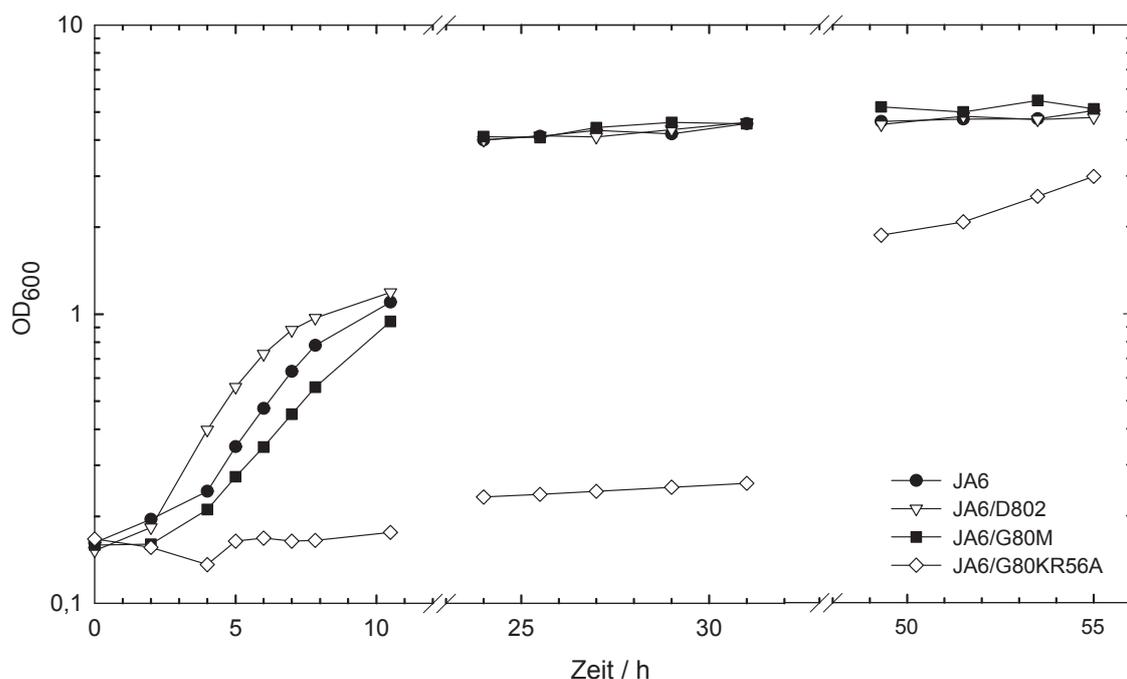
## **3.2 Untersuchung des Einflusses der Lokalisation von *KlGal80p* auf die Reprimier- und Induzierbarkeit des *GAL/LAC*-Schalters**

### **3.2.1 Phänotypische Untersuchung des *KlGal80*-Mutantenstammes JA6/G80-KR56A**

Durch die Konstruktion eines Stammes mit integriertem *KlGal80*-K5A/R6A-Allel (JA6/G80-KR56A) war es möglich, den Einfluss der veränderten Lokalisation des Repressors *KlGal80p* auf den *GAL/LAC*-Schalter zu untersuchen. Dies sollte Erkenntnisse dazu liefern, ob die ausschließliche Kernlokalisation von *KlGal80p* in *K. lactis* für das Funktionieren dieses Transkriptionsschalters nötig ist und wie sich eine Verteilung von Gal80p in der gesamten Zelle, wie sie in *S. cerevisiae* zu finden ist, auf die Regulation der *GAL/LAC*-Gene in *K. lactis* auswirkt.

### Wachstum nach Galactose-Shift

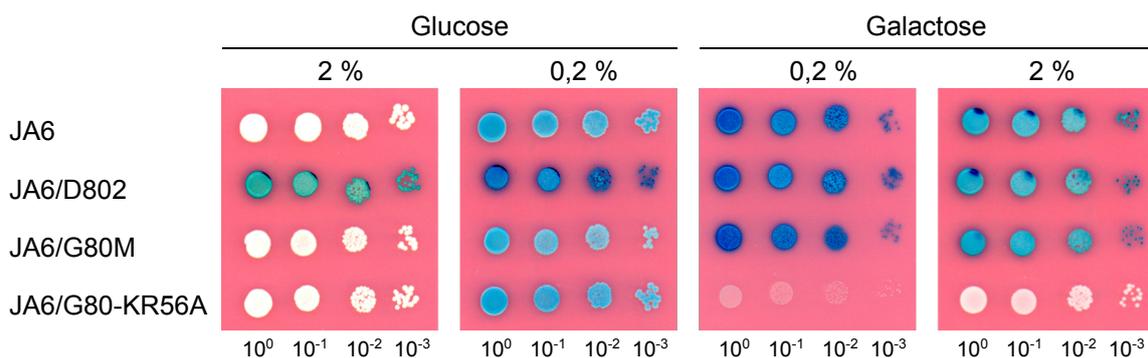
Zur phänotypischen Charakterisierung des Stammes JA6/G80-KR56A wurde eine Wachstumskurve nach *Shift* auf Galactose erstellt (Abbildung 3.5). Als Kontrollen wurden Stämme mit Wildtyp (JA6) oder C-terminal c-Myc-Epitop-markiertem *KlGal80p* (JA6/G80M) sowie ein *KlGal80*-Deletionsstamm (JA6/D802) mitgeführt. Das C-terminale c-Myc-Epitop an *KlGal80p* hat keinen Einfluss auf das Induktionsverhalten des Stammes JA6/G80M. Der Stamm induziert ähnlich gut wie der Wildtyp (JA6). Die Doppelmutation *KlGal80*-K5A/R6A (ebenfalls c-Myc-Epitop-markiert) im Stamm JA6/G80-KR56A hingegen führt zu einem verzögerten Wachstum nach dem *Shift* auf Galactose.



**Abbildung 3.5 Wachstum der JA6/G80-KR56A-Mutante nach Galactose-Shift.** Die Stämme JA6 (Wildtyp), JA6/D802 (*KlGal80* $\Delta$ ), JA6/G80M (*KlGAL80* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) und JA6/G80-KR56A (*KlGal80*-K5A/R6A mit C-terminalem c-Myc-Epitop) wurden in Minimalmedium mit 2 % Glucose angezogen und anschließend in Medium mit 2 % Galactose geshiftet. Dargestellt ist die Zelldichte (OD<sub>600</sub>) in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Galactose-Shift. Es wurden Wachstumskurven in mehreren unabhängigen Experimenten erstellt, hiervon ist eine exemplarisch dargestellt.

## Induktion der LAC-Gene

Zur weiteren Analyse des Induktionsverhaltens der Doppelmutante wurde diese auf X-Gal-haltige Platten getropft (Abbildung 3.6). X-Gal dient hier als Indikator für den Zustand des *GAL/LAC*-Schalters. Die Spaltung von X-Gal durch Lac4p ( $\beta$ -Galactosidase) führt zur Bildung eines indigoblauen Farbstoffes. *LAC4* wird durch *KlGal4p* und *KlGal80p* reguliert, so dass die Expression von Lac4p und die damit verbundene Blaufärbung der Zellen ein funktionales *KlGal4p* und die Ablösung von *KlGal80p* im induzierten Zustand anzeigt. Im reprimierten Zustand tritt hingegen eine Weißfärbung der Zellen auf. Während der Wildtypstamm JA6, der c-Myc-markierte *KlGal80p*-Stamm JA6/G80M und der Mutantenstamm JA6/G80-KR56A auf Glucose reprimiert (weiße Färbung) sind, zeigt der *KlGAL80*-Deletionsstamm JA6/D802 eine Blaufärbung, da das reprimierende *KlGal80p* fehlt (Abbildung 3.6).

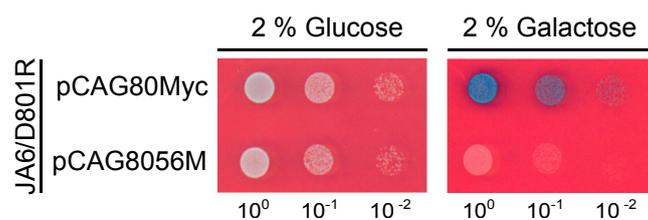


**Abbildung 3.6** Untersuchung der Induzier- und Reprimierbarkeit des Mutantenstamms JA6/G80-KR56A. Die Stämme JA6 (Wildtyp), JA6/D802 (*Klgal80 $\Delta$* ), JA6/G80M (*KlGAL80* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) und JA6/G80-KR56A (*Klgal80*-K5A/R6A mit C-terminalem c-Myc-Epitop) wurden in seriellen Verdünnungen auf X-Gal-haltigen Platten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Auf Niedrigglucose (0,2 % Glucose) liegen dereprimierende Bedingungen vor, das heißt, es findet weder Induktion noch Repression, sondern lediglich die Basalexpression statt. Die Doppelmutante verhält sich auf Glucose wie der Wildtyp. Obwohl die *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante nicht mehr ausschließlich im Kern lokalisiert ist, hat dies keinen negativen Effekt auf die Repression von *KlGal4p*. Auch die Basalexpression ist in dieser Mutante unverändert. Auf Galactose, wo sich *KlGal80p* von *KlGal4p* ablöst und wo die Expression von *KlGal4p*-aktivierten Genen stattfinden

kann, zeigen bis auf die Doppelmutante alle untersuchten Stämme einen blauen Phänotyp. Die Doppelmutante JA6/G80-KR56A ist hingegen auch auf Galactose weiß. Auf Niedriggalactose (0,2 % Galactose) zeigt sie zudem ein Wachstumsdefizit. *KlGal4p* wird im Stamm JA6/G80-KR56A auch auf Galactose reprimiert. *KlGal80p*-K5A/R6A zeigt einen Superrepressor-Phänotyp.

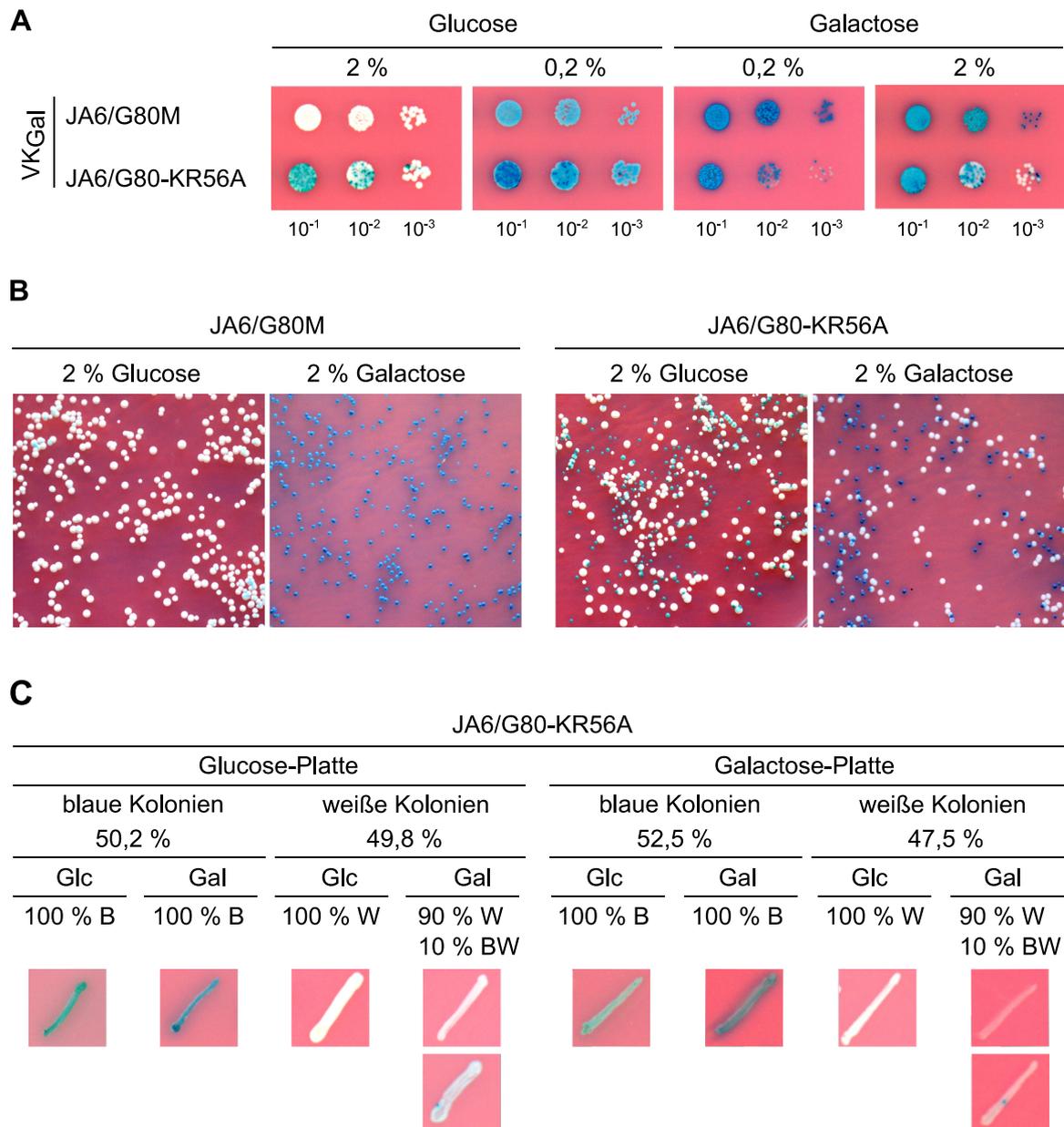
Um sicher zu gehen, dass die beobachteten Effekte nicht auf weitere Mutationen im Stammhintergrund zurückzuführen sind und um autoregulatorisch bedingte Dosis-effekte auszuschließen, wurde als Kontrolle ein *gal80*-Deletionsstamm mit Plasmiden transformiert, welche für *KlGal80p* sowie *KlGal80p*-K5A/R6A mit c-Myc-Epitop kodierten. Mit den Transformanten wurde anschließend ein Tropfentest durchgeführt (Abbildung 3.7). Auch plasmidkodiertes *KlGal80p*-K5A/R6A führt zu einem superreprimierten Phänotyp. Der Phänotyp ist durch die *KlGal80*-Doppelmutation bedingt. Zusätzlich zeigt dieser Test, dass der Phänotyp nicht konzentrationsbedingt ist. Da *KlGal80p* seine eigene Expression reprimiert, unterdrückt die *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante auch auf Galactose die eigene Expression. Die hier verwendeten Plasmide stellen *KlGAL80* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors, was zu einer konstitutiven Expression führt. Dies wurde auch durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.7 Einfluss der deregulierten Expression des *KlGal80p*-Varianten auf die *LAC*-Genexpression.** Der Stamm JA6/D801R wurde mit den Plasmiden pCAG80Myc (*KlGAL80* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) und pCAG8056M (*KlGal80*-K5A/R6A mit C-terminalem c-Myc-Epitop) transformiert. Die Transformanten wurden in seriellen Verdünnungen auf X-Gal enthaltende Platten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Platten wurden für 1 Tag bei 30 °C inkubiert.

Wie die Wachstumskurve (Abbildung 3.5) zeigt, überwindet JA6/G80-KR56A nach einigen Tagen in galactosehaltigem Medium den reprimierten Zustand und kann auf Galactose wachsen. Solche bis zur stationären Phase gewachsene Kulturen wurden für einen X-Gal-Tüpfeltest verwendet. Der auf Galactose vorgezogene Stamm

JA6/G80-KR56A ist auf Galactose nicht mehr vollständig reprimiert, stattdessen treten auch blaue (induzierte) Kolonien auf (Abbildung 3.8A). Der Stamm zeigt einen binären Phänotyp. Einige Zellen können nach längerer Inkubation in galactosehaltigem Medium induzieren, während andere noch superreprimiert sind. Jedoch sind auf der Glucose-Platte ebenfalls blaue und weiße Kolonien zu finden. Somit gibt es hier Kolonien, die auf Glucose nicht mehr reprimieren können. Um zu prüfen, ob die auf Galactose induzierten Zellen ebenfalls nicht mehr auf Glucose reprimieren, wurde eine für vier Tage inkubierte Galactose-Kultur des Stamms JA6/G80-KR56A auf glucose- und galactosehaltige (2 %) Platten ausplattiert (Abbildung 3.8B) und von diesen Platten jeweils 50 blaue und 50 weiße Einzelkolonien auf glucose- und galactosehaltige Platten ausgestrichen (Abbildung 3.8C). Die auf Galactose induzierenden Kolonien waren bei erneutem Ausstrich auf Galactose alle induziert, konnten jedoch nicht mehr auf Glucose reprimieren. Sämtliche auf Galactose reprimierten Kolonien waren nach erneutem Ausstreichen sowohl auf Galactose als auch Glucose reprimiert. Auch die Kolonien von der Glucose-Platte waren entweder sowohl auf Glucose als auch Galactose induziert oder auf beiden Kohlenstoffquellen reprimiert. Bei einem kleinen Teil der Ausstriche zeigten sich auf Galactose einzelne blaue Kolonien in einem ansonsten weißen Ausstrich. Es ist anzunehmen, dass aufgrund des Selektionsdrucks durch das schlechte Wachstum der Mutante auf Galactose *KlGal80-K5A/R6A* zusätzlich mutiert ist. Um dies zu testen wurde *KlGal80-K5A/R6A* in jeweils drei der auf Galactose induzierenden Kolonien aus zwei unterschiedlichen Langzeit-Galactosekulturen sequenziert. Hier zeigte sich, dass *KlGal80-K5A/R6A* in allen drei Kolonien eine zusätzliche Mutation trug. Die drei Kolonien aus jeweils einer Galactose-Langzeitkultur trugen alle die gleiche Mutation (P275R bzw. Q131Stopp). Die Kolonien, welche noch auf Galactose reprimierten, wiesen hingegen keine zusätzlichen Mutationen in *KlGal80-K5A/R6A* auf. Es ist davon auszugehen, dass die Fähigkeit von JA6/G80-KR56A nach längerer Inkubation auf Galactose zu wachsen, mit dem Entstehen von zusätzlichen Mutationen einhergeht. Sowohl die Punktmutation als auch der vorzeitige Translationsstopp in den sequenzierten *KlGal80*-Mutanten führen wahrscheinlich zu nicht repressionsfähigen *KlGal80p*-Varianten, wie die Blaufärbung auf Glucose vermuten lässt. Die Superrepression wird demnach bei längerer Inkubation in Galactose nicht durch Langzeitadaptation, sondern durch spontane Mutationen überwunden.



**Abbildung 3.8** Untersuchung der *LAC*-Genexpression im Stamm JA6/G80-KR56A nach mehrtägigem Wachstum in galactosehaltigem Medium. (A) Die Stämme JA6/G80M (*KlGAL80* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) und JA6/G80-KR56A (*Klgal80-K5A/R6A* mit C-terminalem c-Myc-Epitop) wurden 3 Tage auf Galactose angezogen und anschließend in seriellen Verdünnungen auf X-Gal enthaltende Platten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. (B) Die für 4 Tage in galactosehaltigem Medium inkubierten Kulturen der Stämme JA6/G80M und JA6/G80-KR56A wurden auf eine OD von 0,4 eingestellt, hiervon eine 10<sup>-3</sup> Verdünnung hergestellt und diese auf glucose- und galactosehaltige Platten ausplattiert. (C) Hiervon wurden jeweils 50 blaue und 50 weiße Kolonien wiederum auf Glucose und Galactose-Platten ausgestrichen. Jeweils ein Ausstrich der verschiedenen aufgetretenen Phänotypen ist exemplarisch dargestellt. B – Blauer Ausstrich. W – Weißer Ausstrich. BW – weißer Ausstrich mit einzelnen blauen Kolonien. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 3.2.1.1 Modelle zur Erklärung der verschiedenen Phänotypen von JA6/G80-KR56A

Die Analyse des Stammes JA6/G80-KR56A ergab zwei Phänotypen: eine veränderte Lokalisation von *KlGal80p-K5A/R6A* und eine gestörte Induzierbarkeit. Daraufhin stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Phänotypen bedingen. Hierzu ergaben sich verschiedene Modelle als Erklärungsversuch:

**Modell 1: Die veränderte Lokalisation von *KlGal80p-K5A/R6A* bedingt die Superrepression.** Die Verteilung von *KlGal80p-K5A/R6A* in der gesamten Zelle führt zu einem Zurückhalten von *KlGal1p* im Cytoplasma. Dies hat eine zu geringe *KlGal1p*-Konzentration im Kern zur Folge, um *KlGal80p* von *KlGal4p* abzulösen und die Induktion zu ermöglichen.

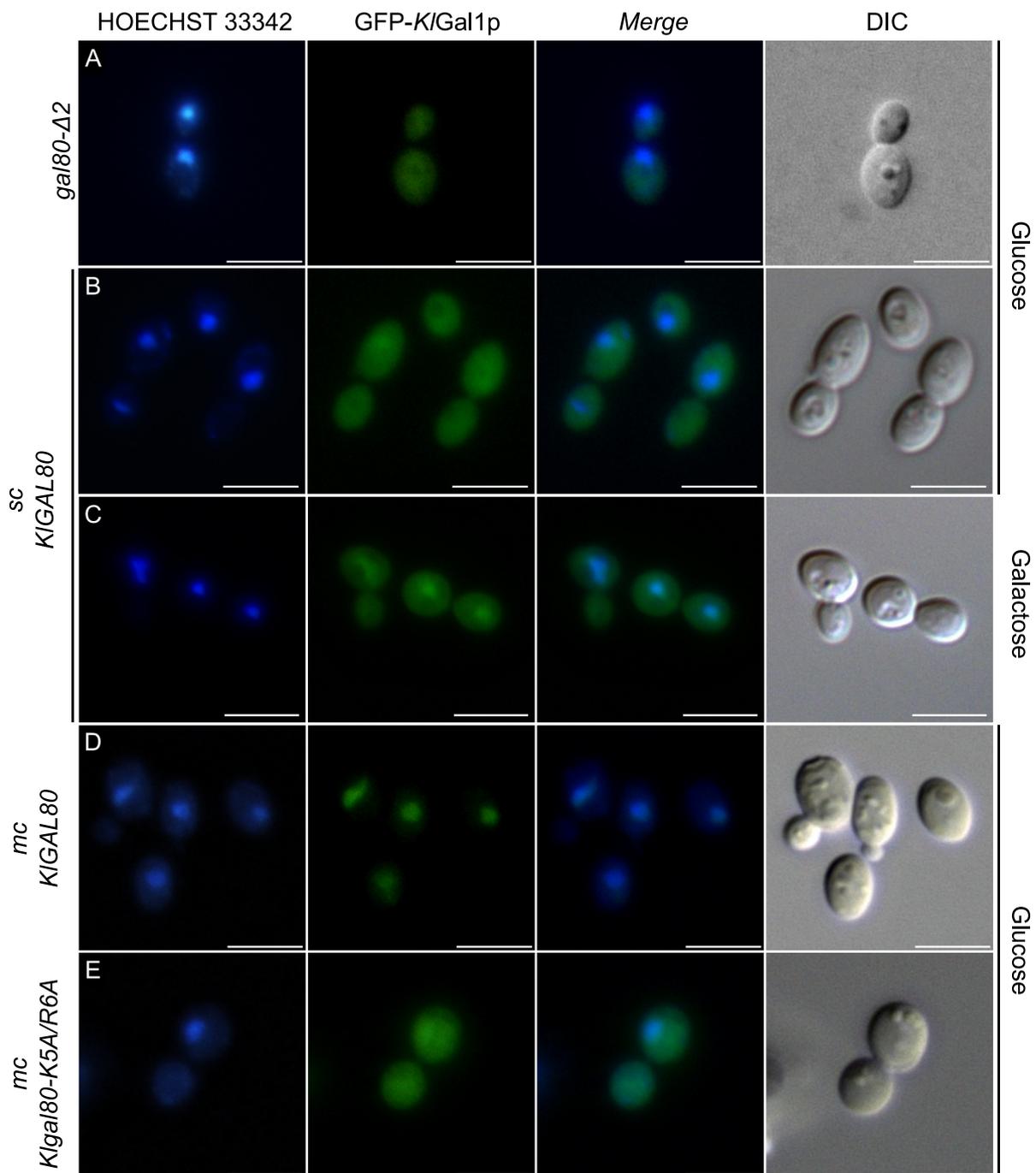
**Modell 2: *KlGal80p-K5A/R6A* bindet schwächer an *KlGal1p*.** Die Doppelmutation hat einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit *KlGal1p*. Dies verhindert das Ablösen von *KlGal80p* von *KlGal4p* und führt zum superreprimierten Phänotyp.

**Modell 3: *KlGal80p-K5A/R6A* bindet stärker an *KlGal4p*.** Eine stärkere Bindung von *KlGal80p-K5A/R6A* an *KlGal4p* erschwert das Ablösen von *KlGal80p* durch Interaktion mit *KlGal1p*. Dies führt zur Superrepression und ist unabhängig von der veränderten Lokalisation.

Basierend auf diesen Modellen wurden die weiteren Experimente abgeleitet.

### 3.2.2 Untersuchung des Einflusses der gestörten Kernlokalisierung von *KlGal80p-K5A/R6A* auf die Lokalisation von *KlGal1p*

Wie bereits von Anders *et al.* (2006) gezeigt, lässt sich die Lokalisation von *KlGal1p* durch das Expressionslevel von *KlGal80p* beeinflussen. In einem *KlGal80*-Deletionsstamm ist *KlGal1p* in der gesamten Zelle verteilt. Liegt eine *KlGal80*-Wildtyp-Kopie vor, so ist *KlGal1p* bei Anzucht der Zellen in Glucose in der Zelle verteilt, in Galactose ist zudem eine leichte Anreicherung im Kern zu beobachten. Die Überexpression von Wildtyp-*KlGal80* führt zu einer starken Akkumulation von *KlGal1p* im Kern. Dieses Experiment wurde hier wiederholt (Abbildung 3.9A-D) und um die Untersuchung der *KlGal80p-K5A/R6A*-Variante erweitert (Abbildung 3.9E).

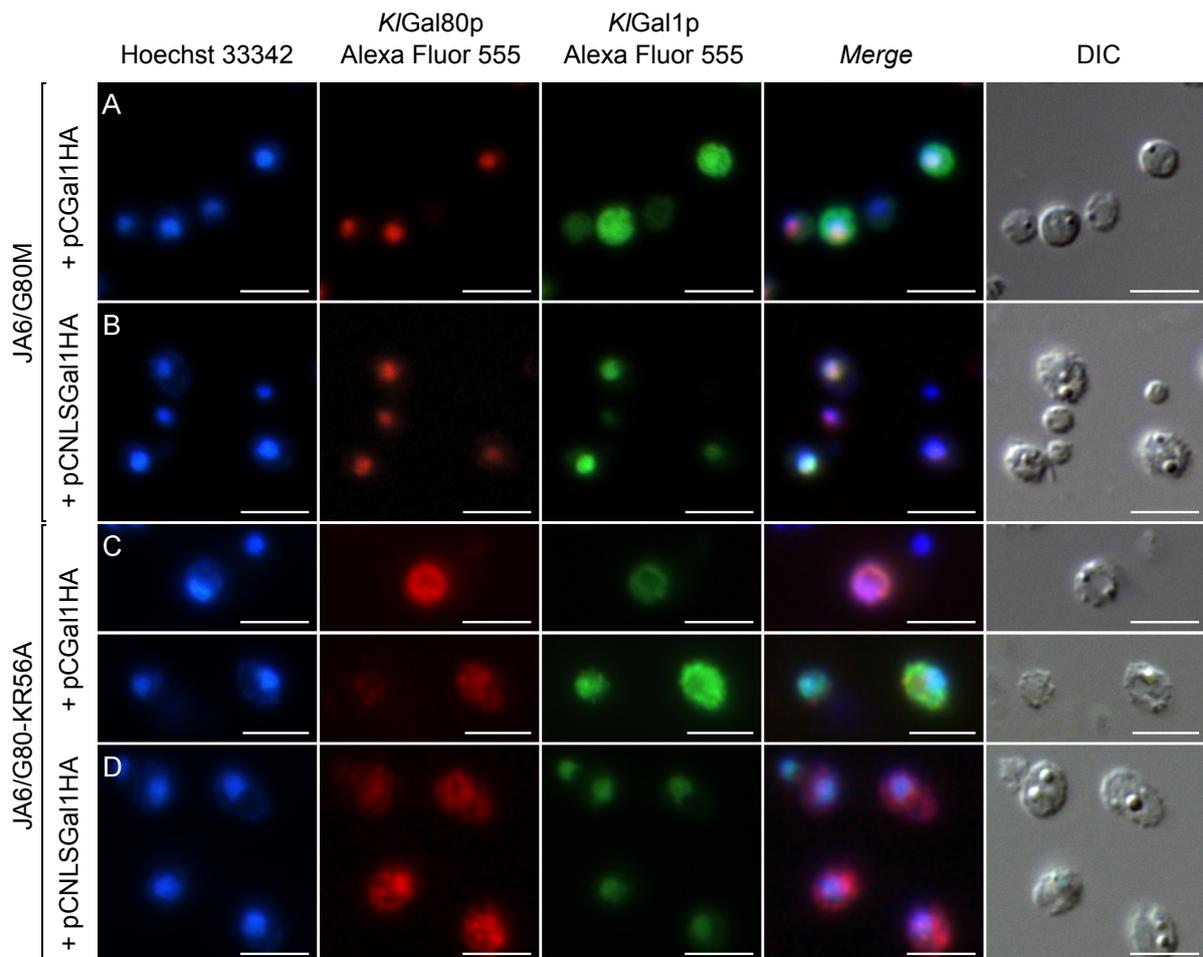


**Abbildung 3.9 Einfluss der Lokalisation von *Klg180p* auf die *Klg1p*-Lokalisation.** (A) Der *Klg11-Klg180*-Deletionsstamm JA6/D1D802R sowie (B) der *Klg11*-Deletionsstamm JA6/D1R mit Wildtyp-*KIGAL80* (*sc KIGAL80*<sup>+</sup>) wurden mit dem Centromer-Plasmid pCGFPAG1 (*sc GFP-KIGAL1*), welches für ein GFP-*Klg1p* Fusionsprotein codiert, transformiert. (C) JA6/D1D802R wurde zudem sowohl mit pCGFPAG1-*ura3Δ* als auch pEAG80 (*mc KIGAL80*<sup>+</sup>) bzw. (D) pEAG80-KR56A (*mc GAL80KR56A*) transformiert. Die Zellen wurden in selektivem Minimalmedium mit 2 % Glucose angezogen und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Kern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt, *Klg1p* war durch die Fluoreszenz des GFP zu beobachten. *sc*: single copy. *mc*: multicopy. Merge: überlagerte Kanäle. DIC: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5 μm

Die Überexpression von *KlGal80p* und die Expression von GFP-fusioniertem *KlGal1p* erfolgte plasmidkodiert von konstitutiven Promotoren, um autoregulatorisch bedingte Dosiseffekte auszuschließen. Die Zellen wurden sowohl in Glucose als auch Galactose angezogen und mikroskopisch untersucht. Außer für die Zellen mit einer Wildtyp-*KlGAL80*-Kopie (*sc KlGAL80*) konnte kein Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Lokalisation beobachtet werden.

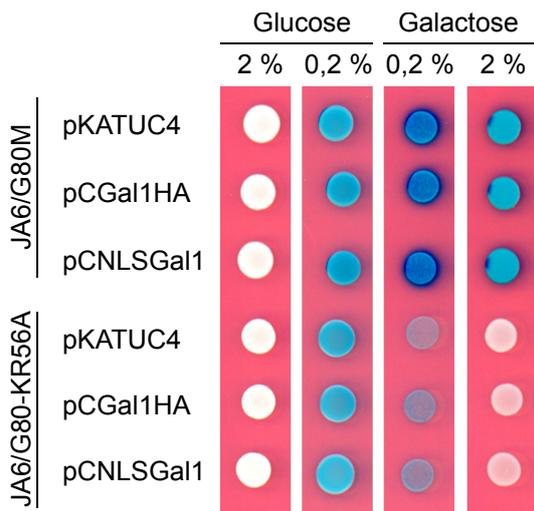
Die Überexpression von *KlGal80-K5A/R6A* führt, anders als beim Wildtyp, nicht zu einer Kernakkumulation von *KlGal1p*. Letzteres ist in der gesamten Zelle verteilt. Die Tatsache, dass *KlGal1p* bei Überexpression von *KlGal80p-K5A/R6A* nicht im Kern akkumuliert, könnte Modell 1 stützen: Die gestörte Kernlokalisierung von *KlGal80p-K5A/R6A* führt zum Zurückhalten von *KlGal1p* im Cytoplasma. Dies könnte einen Mangel an *KlGal1p* im Kern verursachen und die Induktion behindern.

Wenn dies der Fall ist, müsste eine künstliche Kernlokalisierung von *KlGal1p* durch Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) den Effekt der *KlGal80p-K5A/R6A*-Variante supprimieren. Die Stämme JA6/G80M und JA6/G80-KR56A wurden daher mit pCGal1HA (*KlGAL1* mit 6 x HA-Epitop) und pCNLSGal1HA (*KlGAL1* mit N-terminaler SV40-NLS und 6 x HA-Epitop) transformiert. Die Fusion mit dem Kernlokalisierungssignal (MGAPPKKKRKVA) des „Simian-Virus 40 large T-Antigen“ (SV40) sollte ein ausschließlich kernlokalisiertes *KlGal1p* schaffen. Zur Überprüfung der Kernlokalisierung wurden die Transformanten immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 3.10). Wildtyp-*KlGal80p* ist im Kern lokalisiert (Abbildung: 3.10A und 3.10B), während die *KlGal80p-K5A/R6A*-Variante in der gesamten Zelle verteilt ist (Abbildung 3.10C und 3.10D). Wildtyp-*KlGal1p* ist ebenfalls in der gesamten Zelle verteilt (Abbildung 3.10A und 3.10C), in Anwesenheit von Wildtyp-*KlGal80p* (Abbildung 3.10A) ist für *KlGal1p* eine leichte Anreicherung im Kern zu beobachten. Die N-terminale SV40-NLS-Fusion an *KlGal1p* führt, wie beabsichtigt, zur Kernlokalisierung des Fusionsproteins (Abbildung 3.10B und 3.10D). Die Expression von kernlokalisiertem *KlGal1p* mit SV40-NLS hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von *KlGal80p-K5A/R6A*.



**Abbildung 3.10** Untersuchung des Einflusses der Kernlokalisierung von SV40-NLS-*K/Gal1p* auf die *K/Gal80p*-K5A/R6A-Lokalisation. Die Plasmide (A) pCGal1HA (*K/Gal1p*-HA(6x)) und (B) pCNLSGal1HA (SV40-NLS-*K/Gal1p*-HA(6x)) wurden in den Wildtyp-*K/Gal80p*-(c-myc)<sub>3</sub> exprimierenden Stamm JA6/G80M transformiert. Parallel wurden (C) pCGal1HA und (D) pCNLSGal1HA in den Stamm JA6/G80-KR56A, welcher die *K/Gal80p*-K5A/R6A-Variante exprimiert, transformiert. Die Zellen wurden in selektivem Minimalmedium mit 2 % Galactose angezogen. Der Kern wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. *K/Gal80p* wurde über c-Myc- (primär) und Alexa-555-Antikörper (sekundär) angefärbt. *K/Gal1p* wurde über HA- (primär) und Alexa-488-Antikörper (sekundär) angefärbt. *Merge*: überlagerte Kanäle. DIC: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5 µm.

Der Einfluss des kernlokalisierten mit der SV40-NLS fusionierten *K/Gal1p* auf das Induktionsverhalten der transformierten Zellen wurde im X-Gal-Plattentest untersucht. Das NLS-fusionierte *K/Gal1p* hat weder im Wildtyp noch in der Mutante JA6/G80-KR56A einen Einfluss auf das Induktionsverhalten (Abbildung 3.11). JA6/G80-KR56A zeigt weiterhin einen superreprimierten Phänotyp auf Galactose. Somit ist nicht der Mangel an kernlokalisiertem *K/Gal1p* für den superreprimierten Phänotyp verantwortlich. Modell 1 scheidet daher als Erklärungsversuch aus.

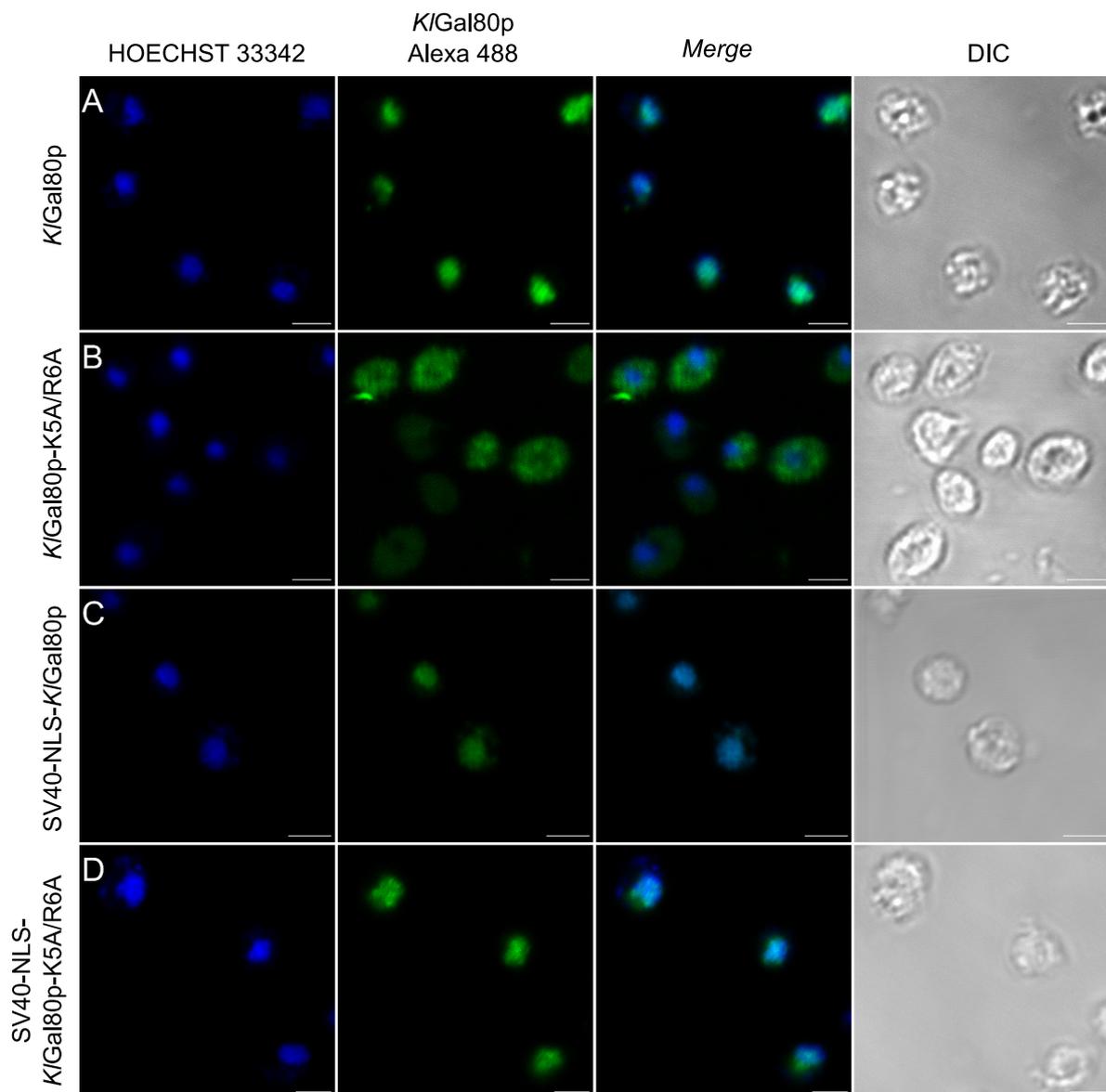


**Abbildung 3.11 Einfluss der Lokalisation von *KlGal1p* auf die Induktion der *LAC*-Gene im Wildtyp- und K5A R6A-Mutantenstamm.** Die Stämme JA6/G80M und JA6/KR56A wurden mit einem Leervektor (pKATUC4) und Vektoren, welche *KlGAL1* mit C-terminalem HA-Epitop, sowie *KlGAL1* mit zusätzlicher N-terminaler SV40-Kernlokalisationssequenz exprimierten, transformiert. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 3.2.3 Phänotypische Untersuchung einer durch SV40-NLS-Fusion kernlokalisierten *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante

In Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, dass es nicht ein Mangel an *KlGal1p* im Kern ist, der zum superreprimierten Phänotyp führt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die veränderte Lokalisation von *KlGal80p*-K5A/R6A also seine Anwesenheit im Cytoplasma oder ein mögliches geringeres Level im Kern einen Effekt auf noch unbekannte Interaktionspartner oder Reaktionswege hat. Um definitiv auszuschließen, dass die veränderte Lokalisation für die Superrepression verantwortlich ist, wurden zwei Stämme konstruiert, welche Wildtyp-*KlGal80p* oder *KlGal80p*-K5A/R6A mit einer N-terminalen Fusion des Kernlokalisationssignals (MGAPPKKRQVA) des „Simian-Virus 40 large T-Antigen“-Proteins (SV40) exprimieren. Ziel war es, einen Stamm zu erzeugen, bei dem die *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante kernlokalisiert ist. Diese Stämme wurden zusammen mit den analogen Stämmen ohne SV40-NLS über ein c-Myc-Epitop immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 3.12). Wie in Abbildung 3.12D zu sehen ist, führt die N-terminale SV40-NLS zu einer Kernlokalisierung der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante.

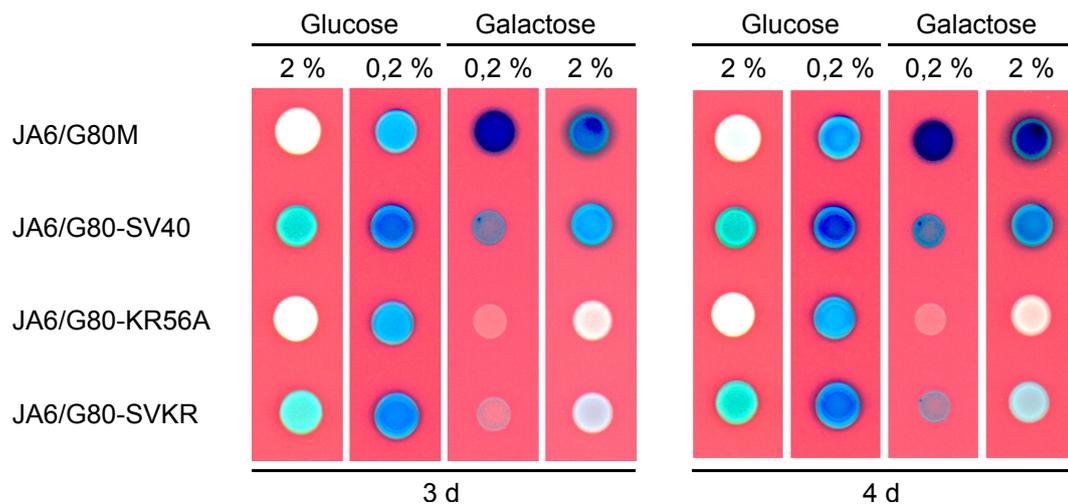
Die Stämme wurden anschließend auf X-Gal-Platten getropft, um den Einfluss der Kernlokalisierung der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante auf deren Repressions- und Induktionsfähigkeit zu untersuchen. Die N-terminale SV40-NLS-Fusion führt sowohl bei Wildtyp-*KlGal80p* (JA6/G80-SV40) als auch bei der Mutante (JA6/G80-SVKR) zu einer leichten Störung der Repression (Abbildung 3.13). Beide zeigen auf Glucose eine schwache Blaufärbung. Auf Galactose ist bei der kernlokalisierten *KlGal80p*-



**Abbildung 3.12** Lokalisation der *K/Gal80p*-Varianten mit N-terminaler SV40-NLS. C-terminal mit c-Myc-Epitop markiertes *K/Gal80p* sowie dessen Varianten wurden immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. **A)** Die Stämme JA6/G80M (Wildtyp-*K/Gal80p*), **(B)** JA6/G80-KR56A (*K/Gal80p*-K5A/R6A), **(C)** JA6/G80SV40 (Wildtyp-*K/Gal80p* mit N-terminaler SV40-NLS), sowie **(D)** JA6/G80SVKR (*K/Gal80p*-K5A/R6A mit SV40-NLS) wurden in Minimalmedium mit 2 % Galactose angezogen. Der Kern wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. *K/Gal80p* und dessen Varianten wurden über c-Myc- (primär) und Alexa488-Antikörper (sekundär) angefärbt. *Merge*: überlagerte Kanäle. DIC: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 2  $\mu$ m.

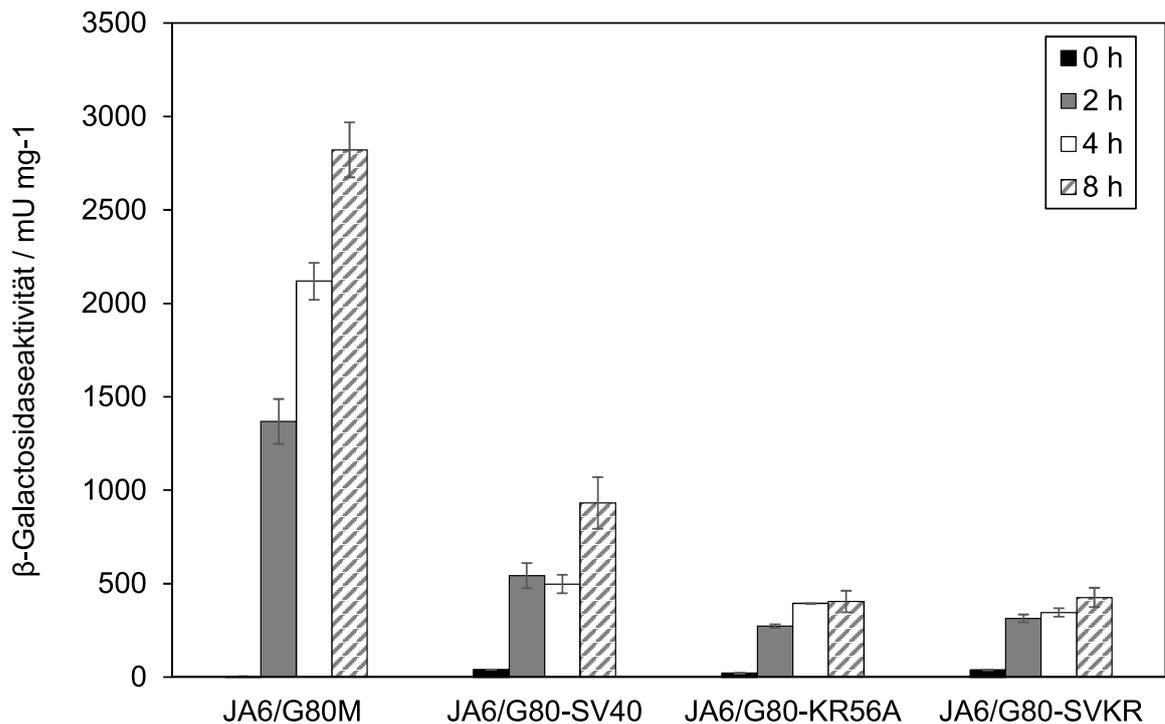
SVKR-Variante nach 4 Tagen eine sehr schwache Blaufärbung zu erkennen. Dies könnte zum einen auf eine leichte Suppression des Phänotyps durch die veränderte Lokalisation deuten. Es könnte aber auch die allgemeine Störung der Repression,

das heißt eine Schwächung der *KlGal4p-KlGal80p*-Interaktion, sein, die zu dieser schwachen Blaufärbung führt. Interessanterweise zeigt Wildtyp-*KlGal80p* mit SV40-NLS auf Galactose eine eher schwächere Induktion als Wildtyp-*KlGal80p*. Die unterschiedlichen Veränderungen (SV40-Fusion und Doppelmutation) am N-Terminus von *KlGal80p* zeigen einen großen Einfluss auf die Induktionsfähigkeit der mutierten Stämme auf Galactose.



**Abbildung 3.13 Einfluss der *KlGal80p*-K5A/R6A-Lokalisation auf die Repression.** Stämme, welche Wildtyp-*GAL80* (JA6/G80M), *gal80-K5A/R6A* (JA6/G80-KR56A) sowie Wildtyp-*GAL80* und *gal80-K5A/R6A* mit zusätzlicher N-terminaler SV40-NLS-Sequenz (JA6/G80SV40 bzw. JA6/G80SVKR) exprimieren, wurden auf YNB-Platten mit X-Gal und den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Platten wurden für 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Der X-Gal-Plattentest misst die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität über einen sehr langen Zeitraum, wodurch es zu einem kumulativen Effekt kommt. Zusätzlich wurde daher die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von Proteinextrakten aus Flüssigkultur im  $\beta$ -Galactosidase-Assay (siehe Abschnitt 2.3.9) untersucht (Abbildung 3.14). Die Kulturen wurden von Glucose auf Galactose geschiftet und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen. Während der Wildtyp (JA6/G80M) schon nach zwei Stunden deutlich induziert, zeigt die JA6/G80-SV40-Variante eine stark verminderte Induktion, die auch nach acht Stunden nicht annähernd das Wildtyplevel erreicht. Die beiden Mutantenstämme JA6/G80-KR56A und JA6/G80-SVKR zeigen auch nach acht Stunden nur eine sehr schwache Induktion. Die N-terminale Fusion der SV40-NLS an *KlGal80p* führt also sowohl zu einer Störung der Repression auf Glucose, wie im X-Gal-Plattentest zu sehen ist, als auch zu einer Störung der Induktion. Da



**Abbildung 3.14 Bestimmung der Induktionsfähigkeit von JA6/G80-SVCR im  $\beta$ -Galactosidase-Assay.** Die Stämme JA6/G80M, -KR56A, -SV40 und -SVCR wurden auf Glucose angezogen, auf Galactose geschiftet und zu den angegebenen Zeitpunkt nach dem *Shift* Proben genommen, deren  $\beta$ -Galactosidaseaktivität gemessen wurde. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils drei verschiedene Volumina mit je vier technischen Replikaten gemessen wurden.

die *KlGal80p-SV40*-Variante wie der Wildtyp im Kern lokalisiert ist, ist nicht die Lokalisation für den Phänotyp verantwortlich. Möglicherweise beeinträchtigt die N-terminale Fusion die Interaktion mit beiden regulatorischen Proteinen (*KlGal4p*, *KlGal1p*).

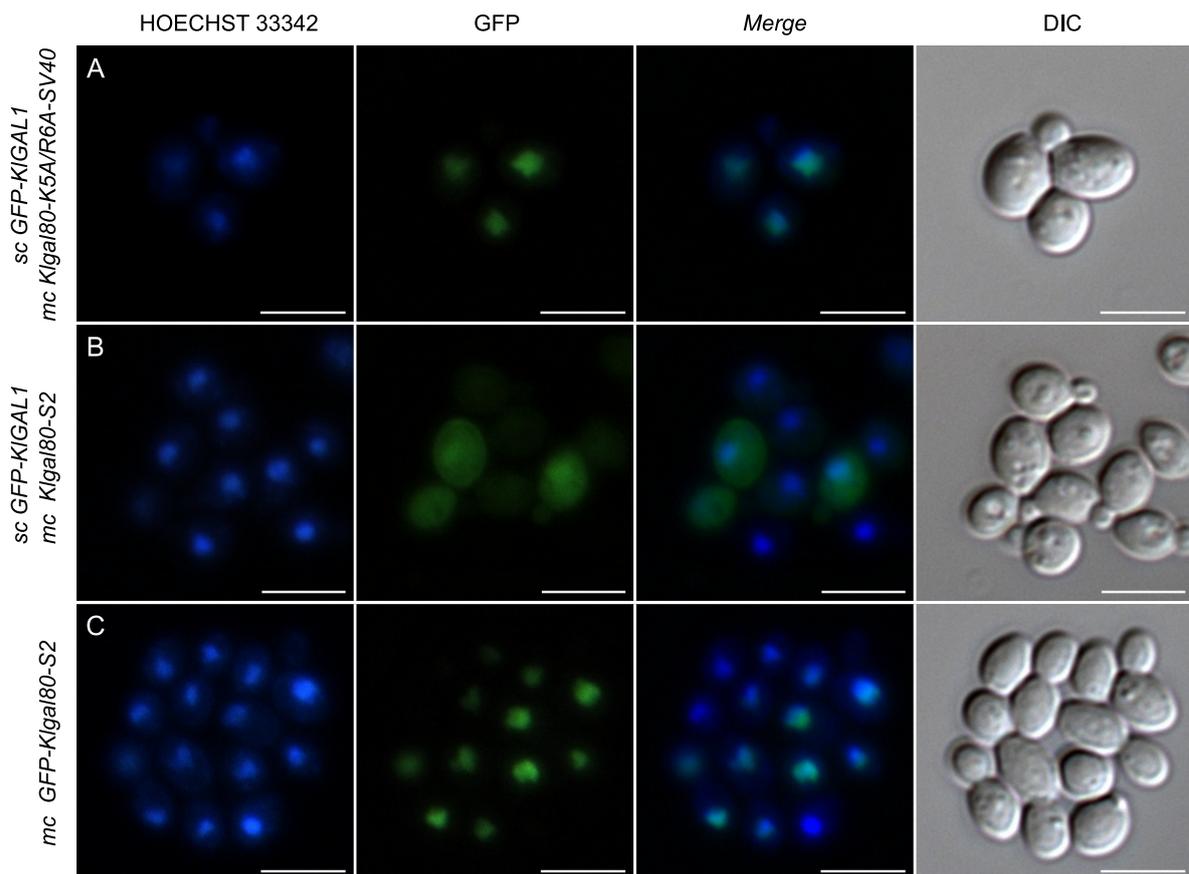
Zwischen JA6/G80-KR56A und JA6/G80-SVCR sind kaum Unterschiede im Induktionsverhalten zu beobachten. Die schwache Blaufärbung von JA6/G80-SVCR im X-Gal-Plattentest (Abbildung 3.13) tritt erst nach mehrtägiger Inkubation auf. Die Kernlokalisierung der *KlGal80p-SVCR*-Variante hat zumindest in den ersten acht Stunden nach Galactose-*Shift* keinen deutlichen positiven Effekt auf die Induktion im Vergleich zur nicht kernlokalisierten *KlGal80p*-Variante in JA6/G80-KR56A (im t-Test kein signifikanter Unterschied der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität 8 Stunden nach Galactose-*Shift*). Im Gegensatz dazu ist der Unterschied zwischen den Stämmen mit kernlokalisiertem *KlGal80p-SV40* bzw. *KlGal80p-SVCR* hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Trotz Kernlokalisierung der *KlGal80p-SVCR*-Variante zeigt der Stamm JA6/G80-SVCR

eine deutlich schlechtere Induktion als JA6/G80-SV40, welcher Wildtyp-*KlGal80p* mit SV40-NLS exprimiert, und keinen signifikanten Unterschied zu JA6/G80-KR56A. Somit ist gezeigt, dass nicht die gestörte Kernlokalisierung der Variante *KlGal80p*-K5A/R6A, sondern ein weiterer Effekt der Doppelmutation für den superreprimierten Phänotyp verantwortlich ist.

### 3.2.4 Abhängigkeit der *KlGal1p*-Lokalisation von *KlGal80p*

In Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, dass die Überexpression von *KlGal80p* zu einer Kernlokalisierung von *KlGal1p* führt, jedoch die in der Kernlokalisierung gestörte *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante dies nicht mehr vermag. Es stellte sich daher die Frage, welchen Einfluss die durch eine SV40-NLS kernlokalisierte *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante (*KlGal80p*-SVKR) auf die *KlGal1p*-Lokalisation hat. Abbildung 3.15A zeigt, dass *KlGal1p* in Anwesenheit von *KlGal80p*-SVKR kernlokalisiert ist. Dies bestätigt eine Abhängigkeit der *KlGal1p*-Lokalisation von der Lokalisation von *KlGal80p*.

Um zu prüfen, ob diese Co-Lokalisation interaktionsabhängig ist, wurde zudem die in der *KlGal1p*-Interaktion gestörte *KlGal80p*-S2-Variante untersucht. Diese Variante ist selbst, wie Wildtyp-*KlGal80p*, im Kern lokalisiert (Abbildung 3.15C). Die Überexpression von *KlGal80p*-S2 führt jedoch nicht zu einer Kernakkumulation von *KlGal1p* (Abbildung 3.15B). Die Co-Lokalisation ist demnach anscheinend nicht möglich, wenn beide Proteine nicht mehr interagieren.



**Abbildung 3.15** Untersuchung der Abhängigkeit der *Klg1p*-Lokalisation von der *Klgal80p*-Lokalisation sowie der *Klg1p*-*Klgal80p*-Interaktion. Der *Klgal1* und *Klgal80* Deletionsstamm JA6/D1D802R wurde mit (A) pCGFPAG1-ura3 $\Delta$  (*Klg1p* mit GFP-Fusion) und pEAG80-KR56A-SV40 (*Klgal80p*-K5A/R6A mit N-terminaler SV40-NLS-Fusion) bzw. (B) pEAG80S2 (*Klgal80-S2* (E367K)) transformiert. (C) Der *Klgal80* Deletionsstamm JA6/D802R wurde mit pEGFP-G80-S2 (*Klgal80-S2*) transformiert. Die Zellen wurden in selektivem Minimalmedium mit 2 % Glucose angezogen. Der Kern wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Merge: überlagerte Kanäle. DIC: Differentialinterferenzkontrast. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

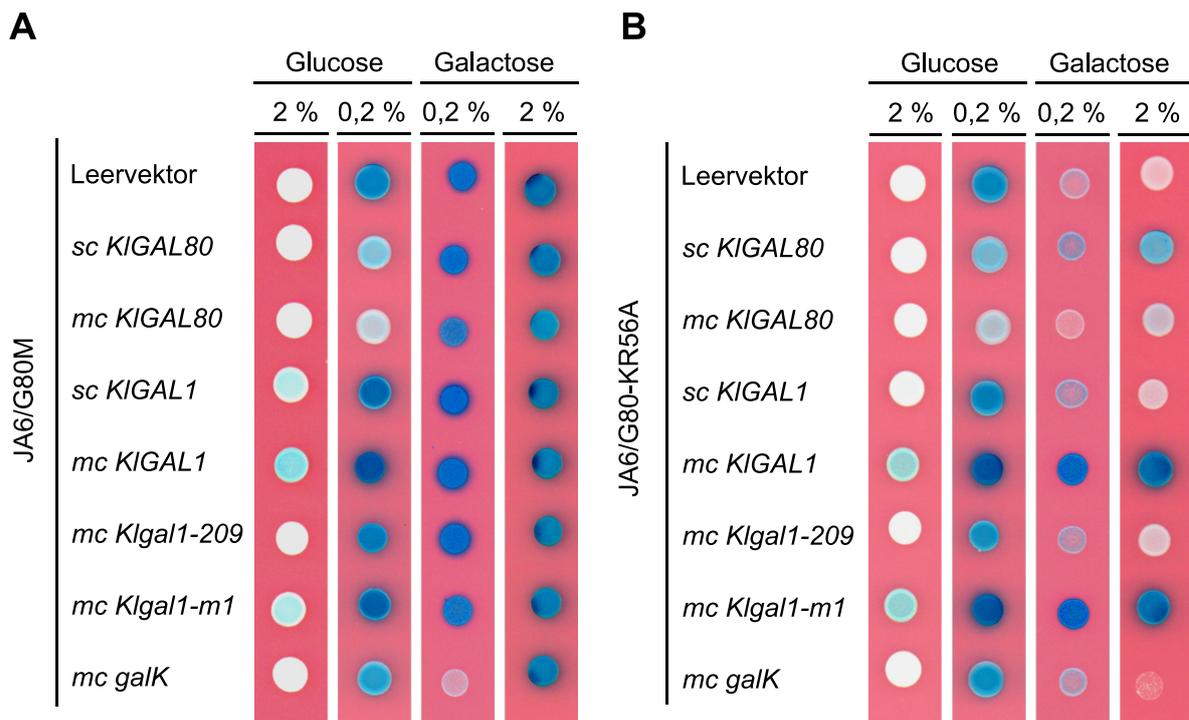
### 3.2.5 Untersuchung auf Dominanz und Supprimierbarkeit des superreprimierten Phänotyps der JA6/G80-KR56A-Mutante

Um zu prüfen, ob der Effekt der N-terminalen Doppelmutation in *Klgal80p*-K5A/R6A dominant ist, wurden die Stämme JA6/G80M (Wildtyp-*KIGAL80* mit c-Myc-Epitop) sowie JA6/G80-KR56A (*Klgal80-KR56A* mit c-Myc-Epitop) mit Plasmiden, die Wildtyp-*KIGAL80* als Einfachkopie (pC80) oder auf einem Multikopieplasmid (pEAG80) exprimierten, sowie dem Leervektor (pE1) transformiert. Die mit dem Leervektor (pE1) transformierten Zellen zeigen den für die Mutante JA6/G80-KR56A erwarteten superreprimierten Phänotyp (Abbildung 3.16B). Die Expression

einer zusätzlichen Kopie Wildtyp-*KIGAL80* führt zu einer partiellen Suppression des Phänotyps der Mutante, wie sich durch schwache Induktion auf Galactose zeigt. Eine zusätzliche Kopie Wildtyp-*KIGAL80* kann demnach den Phänotyp der Mutante komplementieren. Die *KlGal80*-Doppelmutation K5A R6A ist rezessiv. Bei Überexpression von Wildtyp-*KIGAL80* (pEAG80) zeigt sich dieser Effekt jedoch nicht, was möglicherweise auf eine *per se* stärkere Repression durch den Überschuss an *KlGal80p* zu erklären ist.

Da der superreprimierte Phänotyp, wie die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, nicht durch die Fehllokalisierung von *KlGal80p*-K5A/R6A verursacht wird, lässt sich dieser Phänotyp am besten durch eine veränderte Interaktion mit den anderen regulatorischen Proteinen *KlGal1p* oder *KlGal4p* (Modell 2 und 3) erklären. Ein negativer Einfluss der Mutation auf die Interaktion mit *KlGal1p* könnte die Induktion auf Galactose stören und so diesen Phänotyp verursachen. Daher wurde geprüft, ob durch Überexpression von *KlGal1p* eine Suppression des superreprimierten Phänotyps erzielt werden kann. Hierzu wurden JA6/G80-KR56A sowie als Kontrolle JA6/G80M mit Plasmiden transformiert, welche Wildtyp-*KIGAL1* konstitutiv exprimieren und einfach (*sc KIGAL1*) oder mehrfach (*mc KIGAL1*) in den Transformanten vorlagen. Während eine zusätzliche *KIGAL1*-Kopie keinen Einfluss auf die Induktion zeigt, kann ein stärkerer Überschuss an *KlGal1p* die schlechte Induktion der Mutante supprimieren (Abbildung 3.16B).

*KlGal1p* ist ein bifunktionales Protein. Es stellte sich daher die Frage, ob beide oder eine dieser Funktionen für den supprimierenden Effekt nötig ist. Es existieren *KIGAL1*-Mutationen, welche auf unterschiedliche Weise in ihrer Funktion als induzierendes Protein oder Galactokinase gestört sind. Die Variante *KlGal1p*-209 (N261Y) interagiert noch mit *KlGal80p*, ist jedoch in ihrer Galactokinaseaktivität gestört (Meyer *et al.*, 1991; Zenke *et al.*, 1996). Die Überexpression dieser *KlGal1p*-Variante konnte den Phänotyp der K5A/R6A-Doppelmutante nicht supprimieren. *KlGal1p*-m1 (E254K) ist als regulationsgestörte, in der Interaktion mit *KlGal80p* beeinträchtigte Variante beschrieben (Vollenbroich *et al.*, 1999). Für *KlGal1p*-m1 konnte im *Pulldown*-Experiment keine direkte Interaktion mit *KlGal80p* gezeigt werden (Zenke *et al.*, 1996). Die enzymatische Funktion ist in dieser Variante jedoch nicht gestört. Die Überexpression von *KlGal1p*-m1 oder *KlGal80p* im *KlGal1-m1* Hintergrund ermöglicht jedoch eine Induktion (Vollenbroich *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2003). Die Überexpression von *KlGal1p*-m1 in JA6/G80-KR56A supprimiert ebenfalls den



**Abbildung 3.16** Suppression des Phänotyps der JA6/G80-K5A/R6A-Mutante. Die Stämme JA6/G80M und JA6/G80-KR56A wurden mit verschiedenen Plasmiden transformiert: (A) pE1 (Leervektor), pC80 (*sc KIGAL80*), pEAG80 (*mc KIGAL80*), pCAG1 (*sc KIGAL1*), pEAG1 (*mc KIGAL1*), pEAG1-209 (*mc Klga1-209*, N261Y), pEAGK1 (*mc galK* Galactokinase aus *E. coli*) und (B) pEAG1-m1 (*mc Klga1-m1* E254K). Die Zellen wurden in seriellen Verdünnungen auf YNB-Platten getropft, welche X-Gal und die angegebenen Kohlenstoffquellen, jedoch zur Selektion kein Uracil enthielten. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und durch Scannen dokumentiert. *sc*: Einzelkopie-, *mc*: Multikopieplasmid

Phänotyp der Mutante. Da nur die *KlGal1p*-Varianten mit Galactokinasefunktion supprimierten, wurde zudem der Effekt der Galactokinase aus *E. coli* (pEAGK1) untersucht, diese konnte jedoch nicht supprimieren. Die Aktivität einer Galactokinase allein reicht demnach nicht aus, um zu supprimieren. Lediglich Wildtyp-*KlGal1p* mit beiden intakten Funktionen und *KlGal1p-m1* mit intakter Galactokinasefunktion und einer Interaktion mit *KlGal80p* bei Überexpression können supprimieren.

### 3.2.6 Bestimmung der Affinität von *KlGal80p-K5A/R6A* für *KlGal1p*.

Da der superreprimierte Phänotyp durch Überexpression von *KlGal1p* supprimiert werden konnte, galt es als nächstes Modell 2, das eine geringere Affinität von *KlGal80p-K5A/R6A* für *KlGal1p* postuliert, zu prüfen. Hierfür wurde ein Galactokinase-Assay durchgeführt. Die Interaktion von *KlGal80p* mit *KlGal1p* führt zur Inhibierung der Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* (Anders *et al.*, 2006). In diesem Galactokinase-Assay wird die NADH-Abnahme photometrisch gemessen und zur Berechnung der Galactokinaseaktivität herangezogen. Die NADH-Abnahme resultiert aus einem gekoppelten, enzymatischen Test (siehe Abschnitt 2.3.10), bei dem ADP, das Reaktionsprodukt der Galactokinase, mit Phosphoenolpyruvat zu ATP und Pyruvat umgesetzt wird, um letzteres dann zu Lactat zu reduzieren. Durch die Zugabe von *KlGal80p* wird die Galactokinaseaktivität reduziert. Eine bindungsgestörte *KlGal80p*-Variante führt daher zu einer höheren enzymatischen Aktivität von *KlGal1p*. Dieser Assay gilt daher als geeignete Methode zur Bestimmung der Affinität von *KlGal80p* für *KlGal1p*.

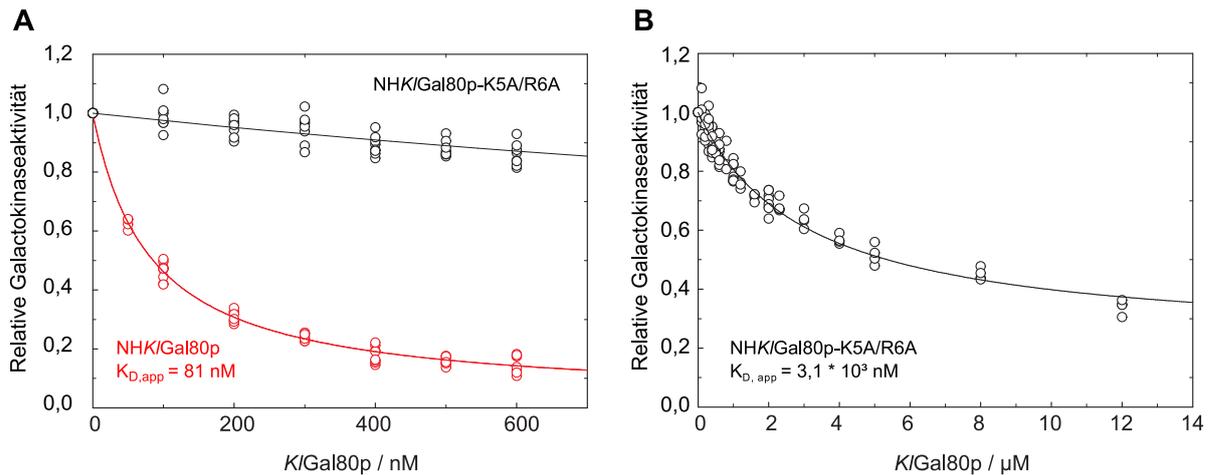
Die Galactokinaseaktivität ohne Zugabe von *KlGal80p* galt hierbei als Referenzwert (100 %). Die Proteine wurden für diese Analysezwecke zuvor durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.7). Die Zugabe von 380 nM *NHKLGal80p* zu 10 nM *KlGal1p* führte zu einer Reduktion der relativen Galactokinaseaktivität um 72 % (Tabelle 3.1). Diese Hemmung kann durch die C-terminalen 22 Aminosäuren der *KlGal4p*-Aktivierungsdomäne (*KlGal4p*-AD22-Peptid) wieder teilweise aufgehoben werden, da es zur Konkurrenz von *KlGal4p*-AD22-Peptid mit *KlGal1p* um die Bindung an *KlGal80p* kommt (Anders *et al.*, 2006). Mit steigender Konzentration von *KlGal4p*-AD22-Peptid erhöht sich entsprechend auch die Galactokinaseaktivität. Hier sollte nun auch die Affinität von *KlGal80p-K5A/R6A* untersucht werden. Wie sich zeigte, hat *KlGal80p-K5A/R6A* kaum einen hemmenden Effekt auf die relative Galactokinaseaktivität von *KlGal1p*. Dies lässt vermuten, dass bei der *KlGal80p-K5A/R6A*-Variante die Interaktion mit *KlGal1p* beeinträchtigt ist. Um die apparente Dissoziationskonstante der *KlGal80p-K5A/R6A-KlGal1p*-Interaktion zu bestimmen, wurde die relative Galactokinaseaktivität bei steigender *KlGal80p-K5A/R6A*-Konzentration ermittelt. Als Vergleich diente Wildtyp-*KlGal80p*. Wie in Abbildung 3.17A zu erkennen ist, nimmt die relative Galactokinaseaktivi-

**Tabelle 3.1 Messung der *KlGal80p*-bedingten Reduktion der Galactokinaseaktivität von *KlGal1p*.** Die relative Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* (10 nM im Messansatz) wurde in An- und Abwesenheit des *KlGal4p*-AD22-Peptids und der angegebenen *KlGal80p*-Varianten (380 nM im Messansatz) gemessen und in Relation zur enzymatischen Aktivität von *KlGal1p* in Abwesenheit von *KlGal80p* gesetzt. Die Werte für Wildtyp-NH*KlGal80p* ohne bzw. mit 2,6  $\mu$ M *KlGal4p*-AD22-Peptid stammen aus drei, die Werte für NH*KlGal80p*-K5A/R6A aus zwei und die übrigen Werte aus einer Messung mit je 4 technischen Replikaten. Die relative Galactokinaseaktivität sowie die Standardabweichung sind in % angegeben.

	<i>KlGal4p</i> -AD22-Peptid		
	-	1,3 $\mu$ M	2,6 $\mu$ M
NH <i>KlGal80p</i>	28,2 $\pm$ 4,7	43,9 $\pm$ 3,9	53,5 $\pm$ 3,7
NH <i>KlGal80p</i> -K5A/R6A	95,6 $\pm$ 4,6	102,3 $\pm$ 1,4	97,7 $\pm$ 2,9

tät mit steigender Konzentration an Wildtyp-*KlGal80p* ab. Für *KlGal80p*-K5A/R6A ist nur eine sehr schwache Abnahme zu erkennen. Zur Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante musste *KlGal80p*-K5A/R6A bis zu einer Konzentration von 12  $\mu$ M zu *KlGal1p* hinzutitriert werden (Abbildung 3.17B). Die Berechnung des  $K_{D, app}$ -Werts erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.10 beschrieben und ergab einen  $K_{D, app}$ - von 3,1  $\mu$ M. (Abbildung 3.17), ein im Vergleich zum Wildtyp (81 nM) sehr hoher Wert.

Die schwächere Inhibierung der Galactokinaseaktivität deutet auf eine beeinträchtigte *KlGal80p*-*KlGal1p*-Interaktion hin. Diese könnte dazu führen, dass *KlGal1p* den reprimierenden Effekt von *KlGal80p*-K5A/R6A auf *KlGal4p* nicht aufheben kann, was zum superreprimierten Phänotyp führt. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal den negativen Einfluss einer N-terminalen Mutation in *KlGal80* auf die *KlGal80p*-*KlGal1p*-Interaktion.

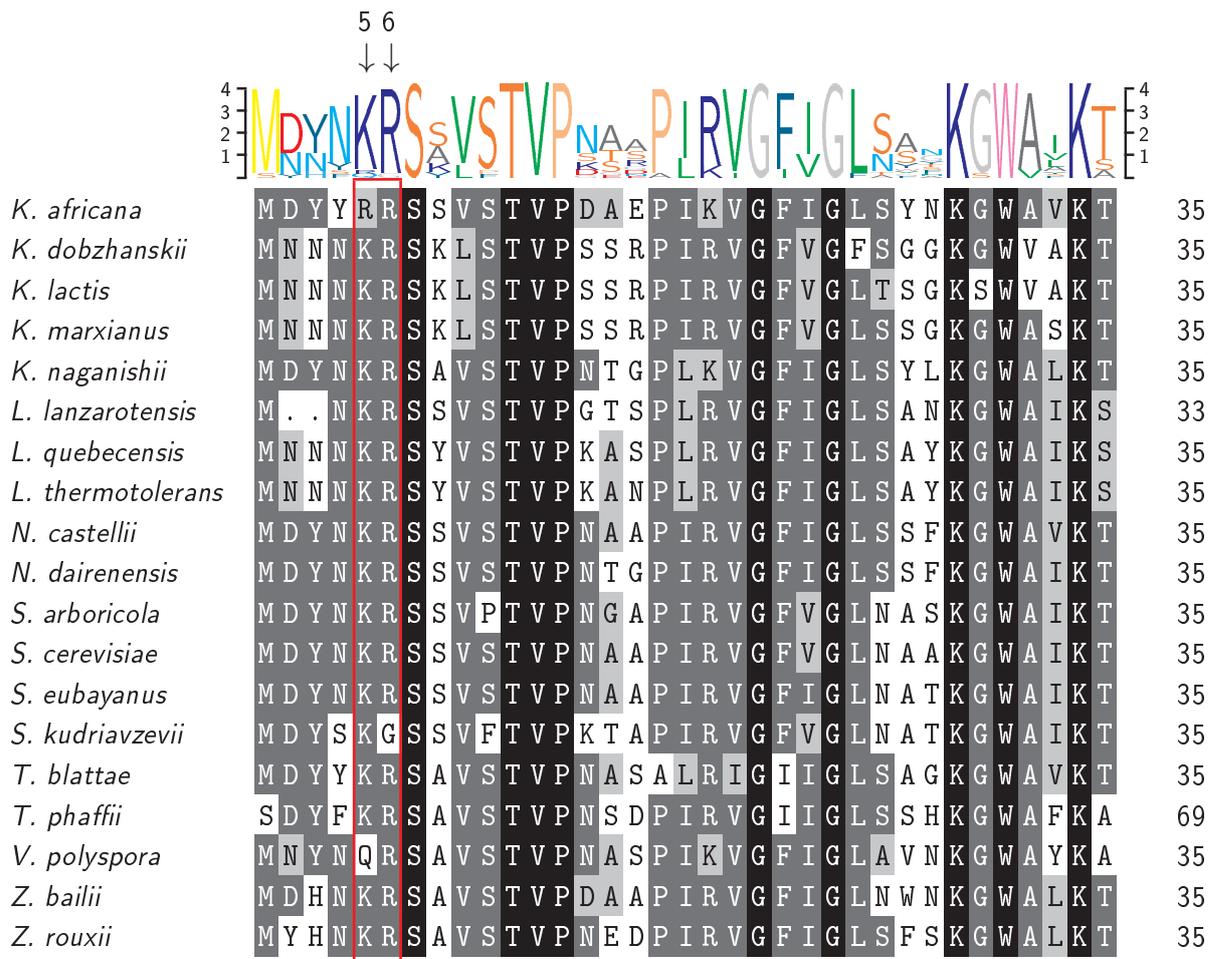


**Abbildung 3.17 Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante für die *KI Gal80p-K5A/R6A-KI Gal1p*-Interaktion.** Messung der *KI Gal1p*-Galactokinaseaktivität bei steigenden *KI Gal80p*-Konzentrationen. Durch Anlegen einer Regressionskurve durch die Messwerte konnte ein  $K_{D,app}$ -Wert für die Affinität von *KI Gal80p* für *KI Gal1p* bestimmt werden. (A) Darstellung der Werte für *KI Gal80p-K5A/R6A* und Wildtyp-*KI Gal80p* bis 600 nM. (B) Darstellung der Werte für *KI Gal80p-K5A/R6A* bis 12  $\mu$ M.  $\circ$  *KI Gal80p*-Wildtyp ( $K_{D,app} = 81$  nM),  $\circ$  *KI Gal80p-K5A/R6A* ( $K_{D,app} = 3,1 \cdot 10^3$  nM). Regressionskurve durch die Messwerte von *KI Gal80p*-Wildtyp (—) und *KI Gal80p-K5A/R6A* (—). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Messungen mit je vier technischen Replikaten.

### 3.2.7 Untersuchung des Einflusses der Aminosäureaustausche K5A und R6A in *ScGal80p* auf die Induktion und Repression

Die mutierten Aminosäuren K5 und R6, welche in *KI Gal80p* die Kernlokalisierung und die Interaktion mit *KI Gal1p* beeinflussen, sind in den *GAL80*-Homologen zahlreicher Hefen konserviert (Abbildung 3.18). Um den Einfluss der Aminosäureaustausche K5A und R6A in *ScGal80p* auf das Induktionsverhalten in *S. cerevisiae* zu untersuchen, wurde diese Doppelmutation auch in *ScGAL80* eingefügt. *S. cerevisiae* besitzt im Gegensatz zu *K. lactis* keine *LAC*-Gene, weshalb normalerweise keine  $\beta$ -Galactosidaseaktivität gemessen werden kann. Um dennoch den X-Gal-Plattentest als Nachweis für die Reprimier- und Induzierbarkeit von Gal4p bzw. Gal80p nutzen zu können, wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm gewählt in den die *LAC*-Gene (*LAC4* und *LAC12*) chromosomal integriert wurden (FI4). Zusätzlich wurde in diesem Stamm *SIN4*, welches für eine Mediatoruntereinheit kodiert, mutiert. Diese Deletion ermöglicht erst die Expression von *LAC4* im *S. cerevisiae*-Stammhintergrund (Langhammer *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Im X-Gal-Plattentest zeigt die *ScGal80p-K5A/R6A*-Variante keinen Einfluss auf die

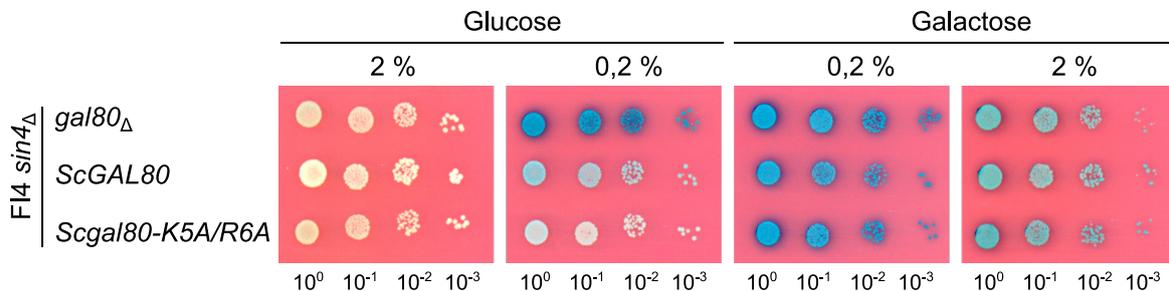


- X nicht konserviert
- X ähnlich
- X ≥ 50% konserviert
- X alle identisch

**Abbildung 3.18 Proteinsequenzalignment der Gal80p-Homologe.** Ein Proteinsequenzvergleich für die verschiedenen Gal80p-Homologe wurde mit Hilfe von NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) und Texshade (Beitz, 2000) erstellt. Die unterschiedlich konservierten Aminosäurereste sind durch verschiedene Schattierungen, wie in der Legende angegeben, markiert. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Aminosäuren ist durch die Größe der Buchstaben im Sequenzlogo dargestellt.

Induktion auf 2 % Galactose (Abbildung 3.19). Es ist keine Superrepression zu beobachten, die Mutante induziert wie der Wildtyp. Lediglich auf 0,2 % Glucose kann eine etwas stärkere Repression im Vergleich zum Stamm mit Wildtyp-ScGal80 beobachtet werden. Der N-Terminus von ScGal80p hat jedoch anscheinend keinen derart negativen Einfluss auf die ScGal80p-ScGal3p-Interaktion, dass die Indukti-

on erkennbar beeinflusst wäre. Eine Untersuchung im Hinblick auf eine veränderte Lokalisation wurde nicht durchgeführt, da auch Wildtyp-ScGal80p bereits in der gesamten Zelle verteilt ist.



**Abbildung 3.19 Untersuchung der ScGal80p-K5A/R6A-Variante im X-Gal-Plattentest.** Die angegebenen Stämme, welche kein *GAL80* (*gal80Δ*), *ScGAL80* oder *Scgal80-K5A/R6A* exprimierten, wurden in seriellen Verdünnungen auf eine YNB Platte, welche X-Gal und 2 % Galactose enthielt, getropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 3.3 Analyse der in der NADP-Bindung beeinflussten KIGal80p-Mutanten

Neben der Lokalisation und der Interaktion mit dem induzierenden Protein unterscheiden sich ScGal80p und KIGal80p auch in der Wirkung und Affinität für NAD(P). Es ist gezeigt, dass die Bindung des Liganden NADP sowohl an ScGal80p als auch an KIGal80p *in vitro* einen negativen Effekt auf die Interaktion mit Gal4p hat (Kumar *et al.*, 2008; Blüher *et al.*, 2014). NAD hat dagegen in *S. cerevisiae* keinen Effekt, während es in *K. lactis* einen ähnlich negativen Effekt wie NADP hat. Da ScGal80p eine mehr als 50-fach höhere Affinität für NAD und NADP aufweist als KIGal80p (Blüher *et al.*, 2014), stellt sich die Frage, welche Rolle die Ligan­denbindung im Regulationsschalter der *GAL*-Gene spielt. In vorherigen Arbeiten wurden bereits Varianten konstruiert, deren Dinukleotidbindung beeinflusst war. Das Tryptophan 31 zeigte sich hierbei als essentiell für die Dinukleotidbindung (Schmidt, 2010; Kumar *et al.*, 2008). Ein Austausch der für die Dinukleotidbindung nötigen Region von Aminosäure 26–38 aus ScGal80p in die entsprechende Region von KIGal80p (*Domain-Swap*-Variante) führte zu einer KIGal80p-Variante mit ähnlich hoher Affinität für NAD(P) wie ScGal80p (Hey, 2011). Nachdem Varianten mit reduzierter sowie mit erhöhter Affinität für NADP konstruiert worden waren, wurde

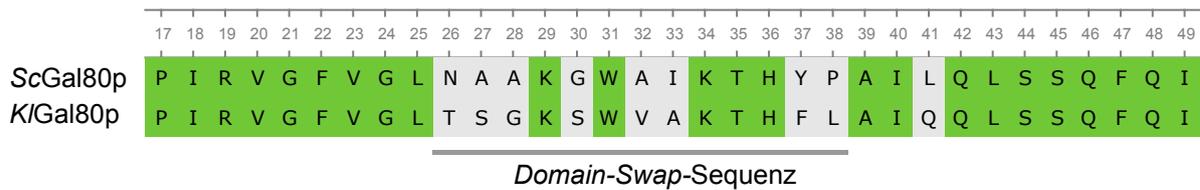
der Einfluss der Dinukleotidbindung auf die Induktion bzw. Repression untersucht. Es ergab sich hier jedoch kein konsistentes Bild.

In den Arbeiten von Schmidt (2010) und Kumar *et al.* (2008) haben sich Unterschiede im Induktionsverhalten der beiden in der Dinukleotidbindung gestörten Varianten *ScGal80p-W31A* und *-W31G* gezeigt. Während in der Arbeit von Schmidt (2010) die *Scgal80-W31G*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp schwächere Repression in 0,2 % Glucose aufwies, zeigte die *Scgal80-W31A*-Mutante bei Kumar *et al.* (2008) keine Störung der Repression. Martin Hey (Hey, 2011) hat daraufhin beide Mutanten vergleichend untersucht und konnte bestätigen, dass die *Scgal80-W31G*-Mutante auf Niedrigglucose-Medium schlechter reprimiert als die *Scgal80-W31A*-Mutante. Der Aminosäureaustausch an Position W31 beeinflusste die Repression in unterschiedlichem Maße. Dies deutet auf eine Rolle dieser Aminosäure in der Interaktion mit anderen Interaktionspartnern hin. Da die Dinukleotidbindung bei allen W31-Varianten gestört ist, kann diese nicht für die Unterschiede verantwortlich sein.

### 3.3.1 Konstruktion weiterer in der NADP-Bindung gestörter *KlGal80p*-Varianten

Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse verschiedener Aminosäureaustausche an Position W31 (*W31A* und *W31G*) auf die Induktion und Repression, wurde in dieser Arbeit der Stamm JA6/G80-W31F konstruiert, welcher eine *KlGal80p*-Variante mit *W31F* Substitution exprimiert. Hierdurch sollte geprüft werden, ob der Austausch der aromatischen Aminosäure Tryptophan zum ebenfalls aromatischen Phenylalanin statt zu Glycin oder Alanin einen weniger starken Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktionen mit *KlGal4p* oder *KlGal1p* hat und dadurch der Effekt der gestörten Dinukleotidbindung unabhängig von sekundären Effekten des Aminosäureaustauschs beurteilt werden kann.

Zur Analyse, wie sich die erhöhte NAD(P)-Affinität in einer *KlGal80p*-Variante auf Induktion und Repression auswirkt, wurde innerhalb dieser Arbeit der Stamm JA6/G80-SW konstruiert, welcher die bereits erwähnte *Domain-Swap*-Variante (*KlGal80p* mit Aminosäureaustausch 26–38 aus *ScGal80p*) exprimiert (Abbildung 3.20). Zusätzlich wurde eine *Domain-Swap*-Variante mit dem Tryptophanaustausch *W31A* (*ScGal80p-SW31*) konstruiert, die durch den Stamm JA6/G80-SW31 exprimiert wird. Hierdurch sollte eine *KlGal80p*-Variante mit dem Aminosäureaustausch

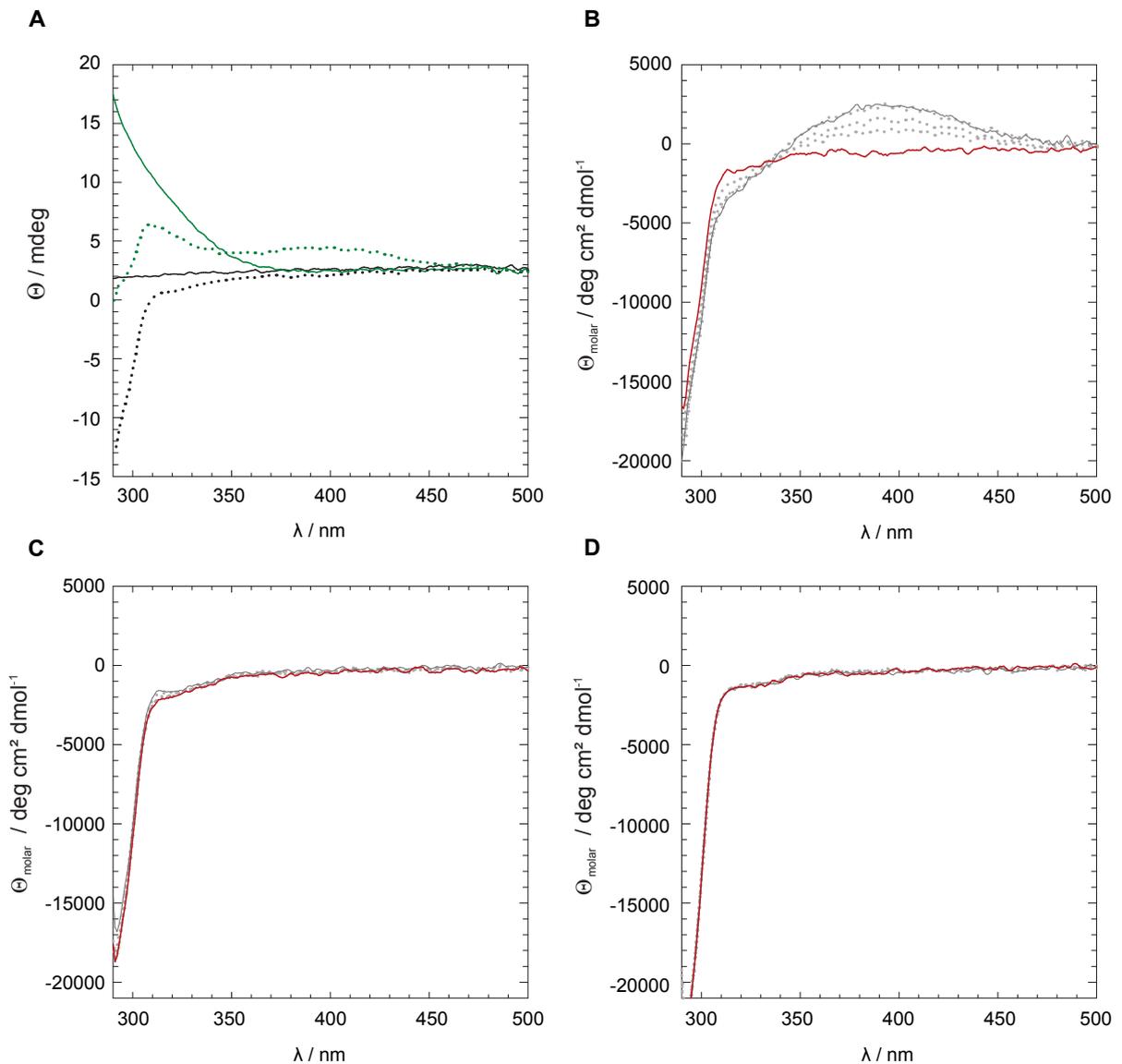


**Abbildung 3.20** Alignment des N-Terminus von ScGal80p und KlGal80p. In der Domain-Swap-Variante wurden die Aminosäuren 26 bis 38 aus ScGal80p mit den äquivalenten Aminosäuren in KlGal80p ausgetauscht. Das Sequenzalignment wurde mittels UGENE Software (Okonechnikov *et al.*, 2012) erstellt. Konservierte Aminosäuren sind grün markiert.

26–38 aber mit gestörter NAD(P)-Bindung erzeugt werden. Diese Variante dient dazu, Effekte, die durch die höhere Affinität für den Liganden bedingt sind, von jenen zu unterscheiden, welche mit einer veränderten Interaktion mit den anderen regulatorischen Proteinen einhergehen.

Zur Überprüfung der Dinukleotidbindefähigkeit der beiden neuen KlGal80p-Varianten -W31F und -SW31 wurden diese mittels Nah-UV-VIS-CD-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.4.2) untersucht. Da das Tryptophan 31 maßgeblich zum Fluoreszenzsignal von KlGal80p beiträgt, konnte die Bestimmung der NADP-Affinität nicht über Fluoreszenzspektroskopie erfolgen. In Abbildung 3.21A sind die unterschiedlichen CD-Rohspektren für NADP allein, für KlGal80p und für KlGal80p mit 1,4 mM NADP dargestellt. Zu den verschiedenen KlGal80p-Varianten wurden steigende Konzentrationen an NADP hinzutitriert und die CD-Spektren gemessen. Die Rohmessdaten wurden um die Werte des freien NADP korrigiert. Bei Wildtyp-NHKlGal80p (Abbildung 3.21B) ist eine Veränderung des Signals bei unterschiedlichen NADP-Konzentrationen zu beobachten. Alle CD-Graphen schneiden sich in einem gemeinsamen Punkt bei circa 335 nm, dem isodichroischen Punkt. Dies ist ein Indiz für eine Konformationsänderung des NADP durch die Interaktion mit NHKlGal80p und deutet auf ein Zwei-Zustandsmodell hin. Für die Varianten NHKlGal80p-W31F (Abbildung 3.21C) und -SW31 (Abbildung 3.21D) ist kein isodichroischer Punkt zu beobachten. Dies zeigt, dass keine Interaktion von NADP mit diesen Varianten erfolgt. Hiermit wurde gezeigt, dass auch der Austausch des Tryp-

tophan 31 zu Phenylalanin zum Verlust der NADP-Bindung führt. Dies ist ebenso die Folge, wenn in der für NADP hochaffinen *Domain-Swap*-Variante das Tryptophan 31 gegen Alanin ausgetauscht wird.

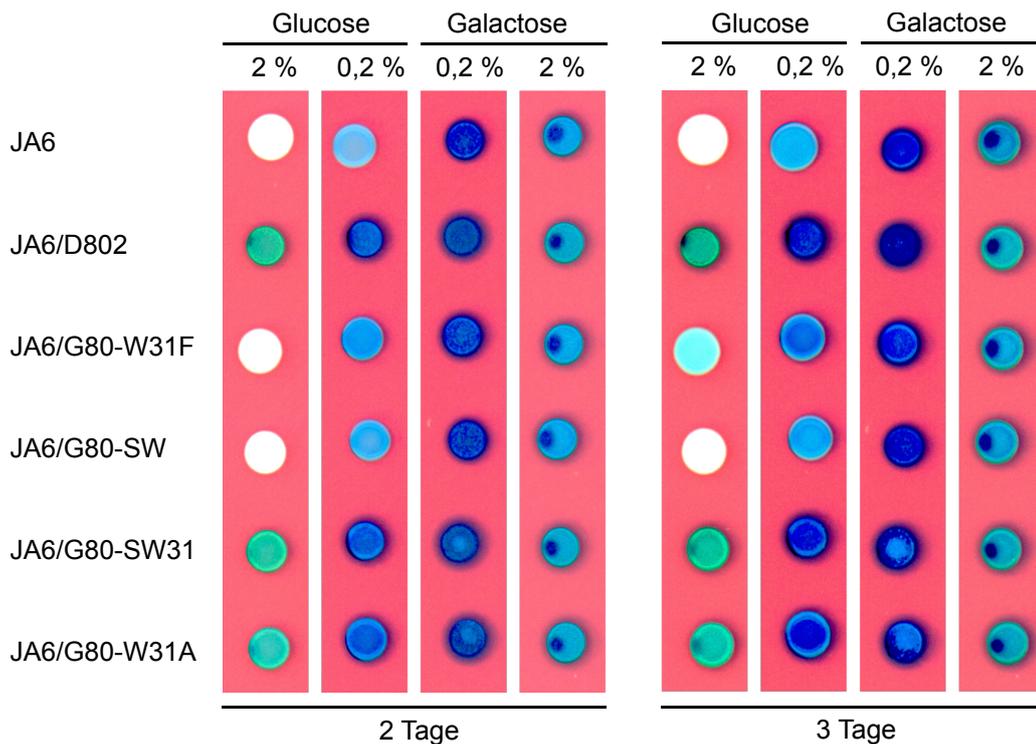


**Abbildung 3.21** Messung der NADP Bindung über Nah-UV/VIS-CD-Spektroskopie. (A) Rohspektren von Puffer ohne (—) und mit 1,5 mM NADP (—) sowie Puffer mit NHK/Gal80 ohne (---) und mit 1,4 mM NADP (---). (B) Korrigierte Spektren der molaren Elliptizität von NHK/Gal80p, (C) NHK/Gal80p-W31F und (D) NHK/Gal80p-SW31 ohne (—), mit 1,4 mM NADP (—) und mit steigenden NADP-Konzentrationen (0,2; 0,5 und 1 mM (---)).

### 3.3.2 Phänotypische Untersuchung der in der NADP-Bindung beeinflussten *KlGal80p*-Varianten

Um zu prüfen, ob sich die unterschiedliche Affinität für NADP *in vivo* auf die Regulation des *GAL/LAC*-Schalters auswirkt, wurden die verschiedenen *KlGal80*-Mutantenstämme phänotypisch mittels X-Gal-Plattentest untersucht (Abbildung 3.22). Zur Analyse des Phänotyps der *KlGal80p*-W31A-Variante wurde zudem der Stamm JA6/G80-W31A konstruiert. Die *KlGal80p*-Varianten -SW und -W31F zeigen nach zwei Tagen einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Phänotyp. JA6/G80-W31F zeigt nach drei Tagen Inkubation eine sehr schwache Blaufärbung auf 2 % Glucose. Der Austausch W31A führt zu einer Störung der Repression auf Glucose ähnlich dem *KlGal80*-Deletionsstamm JA6/D802. Dieser Effekt tritt auch bei einem W31A-Austausch im Kontext der Aminosäuren 26–38 aus *ScGal80p* auf (JA6/G80-SW31). Obwohl die Mutation des Tryptophan 31 immer zu einem Verlust der Dinukleotidbindung führt, hat sie dennoch unterschiedliche Effekte auf die Reprimierbarkeit, abhängig vom jeweiligen Aminosäureaustausch. Das zum Tryptophan strukturell ähnlichere Phenylalanin hat hier einen weitaus schwächeren negativen Einfluss auf die Repression als ein Austausch gegen Alanin. Da NADP *in vitro* die Interaktion von *KlGal80p* mit dem *KlGal4p*-AD22-Peptid stört, hätte erwartet werden können, dass eine höhere Affinität für das Dinukleotid, wie sie die Variante *KlGal80p*-SW zeigt, die *KlGal80p*-*KlGal4p* in höherem Maße stört. Der Stamm JA6/G80-SW zeigte in diesem Assay jedoch keine schwächere Repression als der Wildtyp.

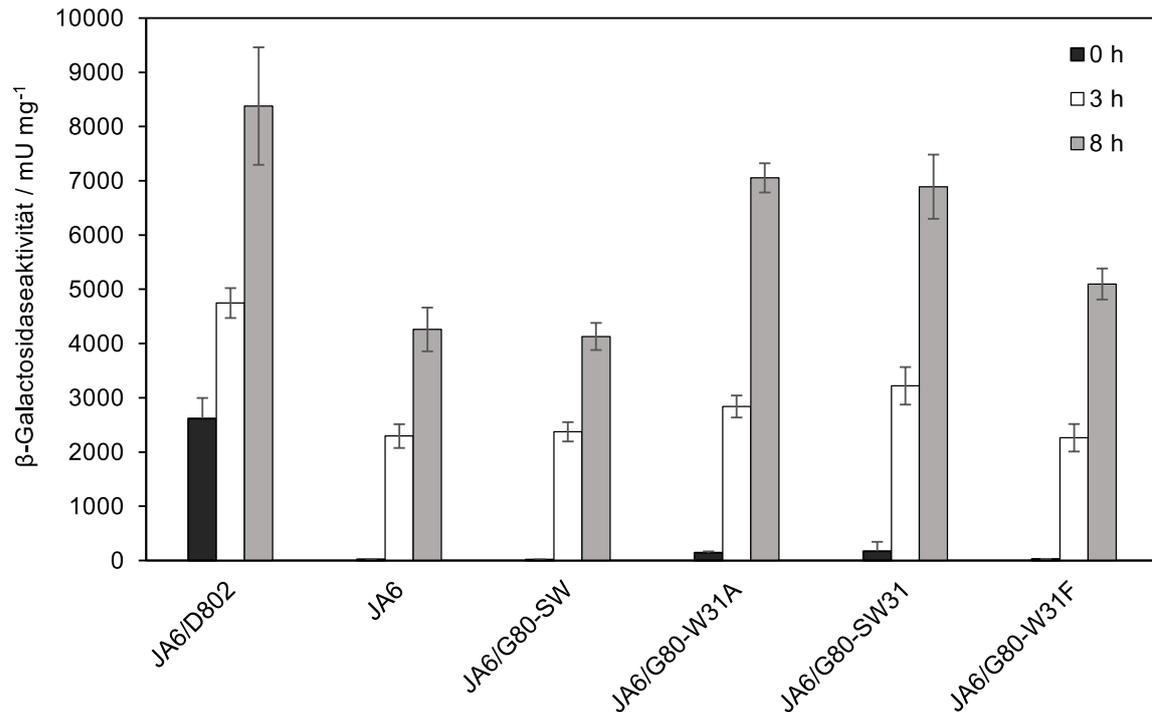
Da alle *KlGal80p*-Varianten im X-Gal-Plattentest eine blaue Färbung auf 2 % Galactose zeigten, wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität zusätzlich mittels  $\beta$ -Galactosidase-Assay gemessen, um eine feinere Differenzierung der Induktionsfähigkeit zu ermöglichen. Die Stämme wurden von Glucose auf Galactose geschiftet und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen (Abbildung 3.23). Acht Stunden nach dem *Shift* zeigt sich kein Unterschied in der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität zwischen Wildtyp JA6 und JA6/G80-SW. Somit kann hier kein Einfluss der im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhten Affinität der *KlGal80p*-SW-Variante für NADP beobachtet werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der *Domain-Swap*-Variante wurde zusätzlich das Tryptophan 31 gegen Alanin ausgetauscht, was zum Verlust der NADP-Bindung führt. Beide resultierenden Mutanten JA6/G80-W31A und JA6/G80-SW31 zeigen eine höhere  $\beta$ -Galactosidaseaktivität auf Galactose, was im Tropfentest assaybedingt



**Abbildung 3.22** Untersuchung der Repressionsfähigkeit verschiedener in der NADP-Bindung veränderter *KlGal80p*-Varianten. Es wurden Wildtypstamm (JA6), ein *KlGal80*-Deletionsstamm (JA6/D802), sowie Stämme, die verschiedene *KlGal80p*-Varianten exprimieren auf YNB-Platten mit X-Gal und den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. JA6/G80-SW exprimiert eine *KlGal80p*-Variante, deren Aminosäuren 26-38 gegen jene aus *ScGal80p* ausgetauscht sind. JA6/G80-SW31 exprimiert eine Variante mit Austausch der Aminosäuren 26-38 sowie W31A. JA6/G80-W31A und JA6/G80-W31F exprimieren *KlGal80p*-Varianten mit einem Aminosäureaustausch W31A bzw. W31F. Die Platten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 3.22). Der Stamm, welcher die ebenfalls in der NADP-Bindung gestörte *KlGal80p*-W31F-Variante exprimiert, zeigt nach drei Stunden eine mit dem Wildtyp vergleichbare ( $P > 0,05$ ), nach acht Stunden jedoch eine erhöhte  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (signifikanter Unterschied zu JA6,  $P < 0,01$ ). Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von JA6/G80-W31F nach 8 Stunden unterscheidet sich höchst signifikant ( $P < 0,001$ ) von JA6/G80-W31A. Da sowohl *KlGal80p*-W31A, -SW31 als auch -W31F nicht mehr NADP binden, ist für diesen Unterschied höchstwahrscheinlich nicht die gestörte NADP-Bindung, sondern eine unterschiedliche Beeinträchtigung der Interaktion mit *KlGal4p* verantwortlich.

Zusammenfassend konnte in diesen Assays unter den gewählten Messbedingungen kein Effekt auf Induktion oder Repression durch die unterschiedliche Affinität für NADP von Wildtyp-*KlGal80p* und *KlGal80p*-SW beobachtet werden. Der Aus-



**Abbildung 3.23 Bestimmung der Induktionsfähigkeit der *KlGal80p*-NADP-Bindemutanten im  $\beta$ -Galactosidase-Assay.** Die Stämme JA6/D802 (*gal80 $\Delta$* ), JA6 (Wildtyp), JA6/G80-SW (*KlGal80p* *Domain-Swap*-Variante), -W31A (*KlGal80p*-W31A-Variante), -SW31 (*Domain-Swap*-Variante mit W31A Substitution) und -W31F (*KlGal80p*-W31F-Variante) wurden auf Glucose angezogen, auf Galactose geschiftet und zu den angegebenen Zeitpunkt nach dem *Shift* Proben genommen, deren  $\beta$ -Galactosidaseaktivität gemessen wurde. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils drei verschiedene Volumina mit je vier technischen Replikaten gemessen wurden.

tausch des Tryptophan 31 zu Alanin in *KlGal80p* und als zusätzliche Mutation in der *Domain-Swap*-Variante *KlGal80p*-SW führt zu einer starken Beeinträchtigung der Repression und schnellerer Induktion. Durch den Austausch des strukturell ähnlichen Phenylalanin kann dieser Effekt abgemildert werden. Da beide Tryptophan-Austausche zu einem Verlust der NADP-Bindefähigkeit führen, ist die schwache Repression durch die Varianten mit W31A-Austausch wahrscheinlich auf eine gestörte *KlGal4p*-Interaktion zurückzuführen. Ein Einfluss der gestörten NADP-Bindung auf die Induktion oder Repression war in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht zu beobachten.

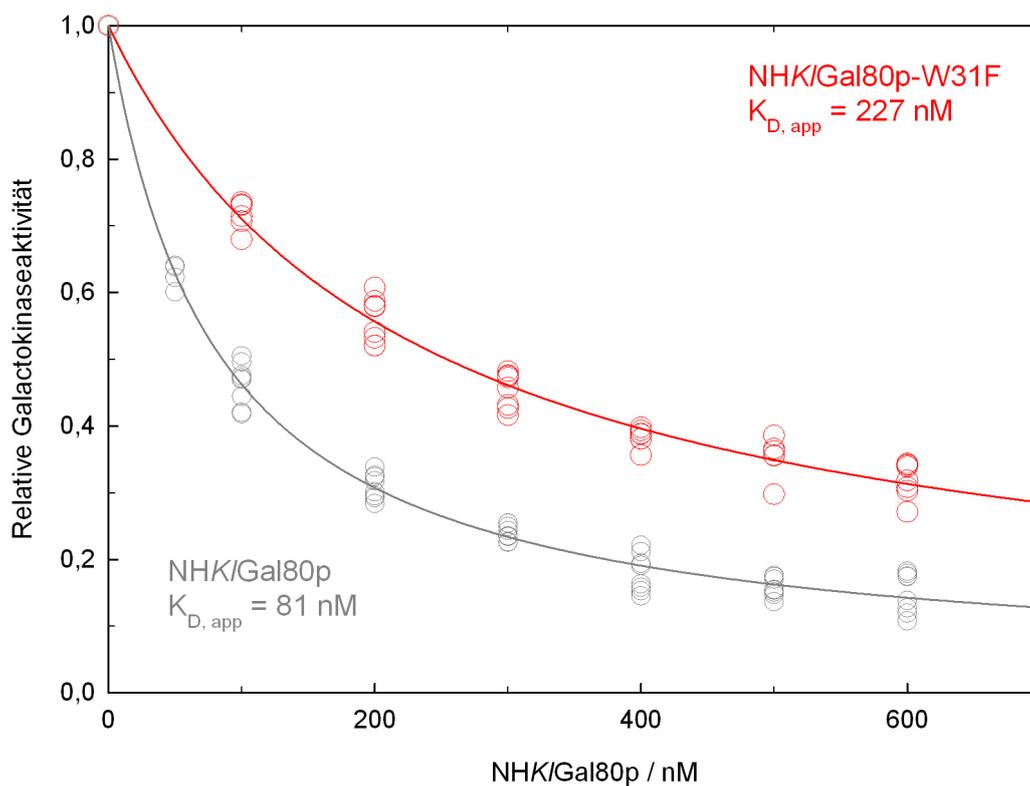
### 3.3.3 Einfluss der Aminosäureaustausche in der NADP-Bindedomäne auf die Interaktion mit *KlGal1p* und *KlGal4p*-AD22-Peptid

Neben den *In-vivo*-Experimenten zur Induktion und Repression der *KlGal80*-Mutanten (Abschnitt 3.3.2) wurde auch *in vitro* die Interaktion von NHKlGal80p-W31F und -SW mit *KlGal1p* und *KlGal4p*-AD22-Peptid in An- und Abwesenheit von NADP untersucht. N-terminal mit einem His-Epitop markiertes NHKlGal80p, -W31F und -SW wurden hierfür affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abschnitt 2.3.7) und im Galactokinase-Inhibierungsassay (Abschnitt 2.3.10) untersucht.

**Tabelle 3.2** Inhibierung der Galactokinasefunktion von *KlGal1p* durch *KlGal80p*-W31F und -SW Die Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* (10 nM im Messansatz) wurde in An- und Abwesenheit des *KlGal4p*-AD22-Peptids, der angegebenen *KlGal80p*-Varianten (380 nM im Messansatz) und NADP (1 mM) unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen (100 mM Kaliumacetat) gemessen und in Relation zur enzymatischen Aktivität von *KlGal1p* in Abwesenheit von *KlGal80p* gesetzt. Die gemittelten Werte für die relative Galactokinasefunktion sind in % und die Standardabweichung ist mit  $\pm$  angegeben. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Messungen mit je vier technischen Replikaten.

	Niedrigsalz			
	<i>KlGal80p</i>		<i>KlGal80p</i> + AD22 [2,6 $\mu$ M]	
	- NADP	+ NADP	- NADP	+ NADP
NHKlGal80p	32,9 $\pm$ 2,2	33,8 $\pm$ 3,5	55,6 $\pm$ 2,5	43,8 $\pm$ 3,5
NHKlGal80p-W31F	45,1 $\pm$ 2,6	46,0 $\pm$ 3,0	60,8 $\pm$ 2,5	60,4 $\pm$ 2,4
NHKlGal80p-SW	47,5 $\pm$ 4,1	46,3 $\pm$ 2,2	60,0 $\pm$ 3,3	48,8 $\pm$ 2,0
	Hochsalz (100 mM KAc)			
	<i>KlGal80p</i>		<i>KlGal80p</i> + AD22 [2,6 $\mu$ M]	
	- NADP	+ NADP	-NADP	+NADP
NHKlGal80p	44,8 $\pm$ 2,9	47,6 $\pm$ 3,5	61,9 $\pm$ 2,3	55,6 $\pm$ 3,5
NHKlGal80p-W31F	62,1 $\pm$ 1,7	66,0 $\pm$ 3,3	73,4 $\pm$ 2,9	74,6 $\pm$ 1,9
NHKlGal80p-SW	60,0 $\pm$ 4,7	61,8 $\pm$ 5,2	70,2 $\pm$ 4,3	60,2 $\pm$ 0,7

Die Zugabe von Wildtyp-NHK/Gal80p reduziert die Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* (Tabelle 3.2). Dieser Effekt wird durch Zugabe von *KlGal4p*-AD22-Peptid und die Konkurrenz des Peptids mit *KlGal1p* um die *KlGal80p*-Bindung abgemildert und die Galactokinaseaktivität steigt. Sowohl NHK/Gal80p-W31F als auch NHK/Gal80p-SW bewirken eine schwächere Reduktion der Galactokinaseaktivität als der Wildtyp (Tabelle 3.2). Dies lässt auf eine verminderte Interaktion mit *KlGal1p* schließen. Die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante (analog zu *KlGal80p*-K5A/R6A in Abschnitt 3.2.6) ergab einen  $K_{D,app}$ -Wert von 227 nM für NHK/Gal80p-W31F (Abbildung 3.24), dieser liegt also über dem gemessenen Wert von 81 nM für Wildtyp-NHK/Gal80p (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.24 Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante für die NHK/Gal80p-W31F-*KlGal1p*-Interaktion.** Messung der *KlGal1p*-Galactokinaseaktivität bei steigenden *KlGal80p*-Konzentrationen. Durch Anlegen einer Regressionskurve durch die Messwerte konnte ein  $K_{D,app}$ -Wert für die Affinität von NHK/Gal80p-W31F für *KlGal1p* bestimmt werden.  $\circ$  Messwerte für *KlGal80p*-W31F aus zwei unabhängigen Messungen mit je vier technischen Replikaten, — Regressionskurve durch die Messwerte von *KlGal80p*-W31F ( $K_{D,app} = 227$  nM).  $\circ$  Die Werte für NHK/Gal80p Wildtyp wurden zur Veranschaulichung aus Abbildung 3.17 übernommen.

Der konkurrierende Effekt von *KlGal1p* und *KlGal4p-AD22*-Peptid um die *KlGal80p*-Bindung fällt sowohl bei *NHKlGal80p-W31F* (Erhöhung der relativen Galactokinaseaktivität durch Zugabe des Peptids um das 1,35fache) als auch bei *NHKlGal80p-SW* (1,26facher Anstieg) geringer aus als beim Wildtyp-*NHKlGal80p* (1,7facher Anstieg, siehe Tabelle 3.2 Niedrigsalzbedingungen ohne NADP). Dies lässt auch einen schwachen, negativen Einfluss auf die Interaktion mit dem *KlGal4p-AD22*-Peptid durch die Aminosäureaustausche in der NADP-Bindedomäne vermuten. Die Austausche in dieser Region haben nicht nur eine veränderte Affinität zu NAD(P) zur Folge, sie beeinflussen auch direkt die Interaktion mit *KlGal1p* und dem *KlGal4p-AD22*-Peptid.

### **Einfluss der unterschiedlichen NADP-Affinität auf die Interaktion mit dem *KlGal4p-AD22*-Peptid**

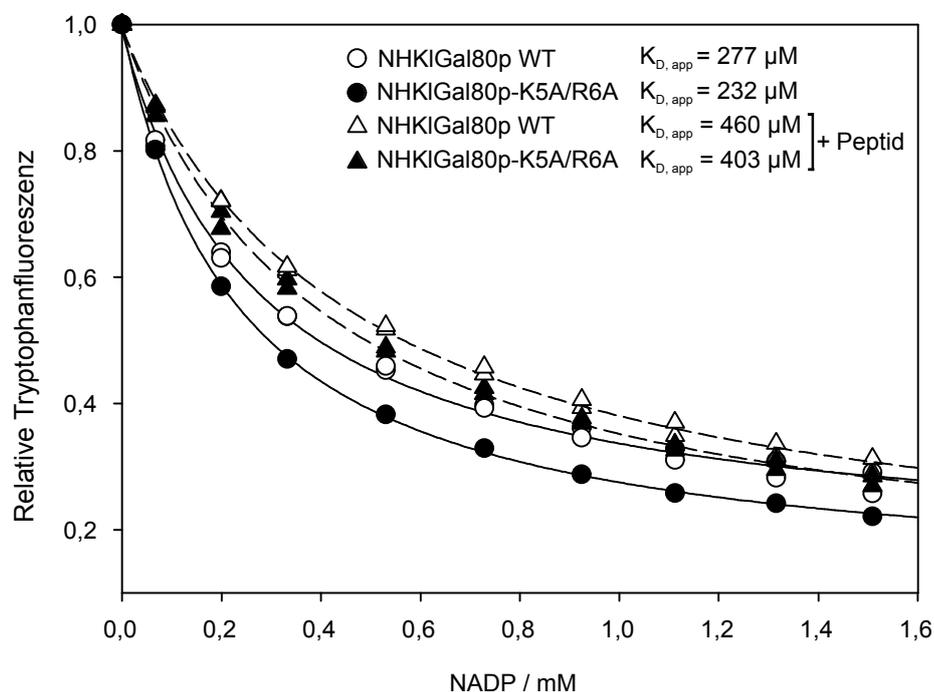
Während die An- und Abwesenheit von NADP ohne Zugabe des Peptids keinen Einfluss auf die *KlGal80p-KlGal1p*-Interaktion hat, ist in Anwesenheit des Peptids ein negativer Einfluss von NADP auf die *KlGal80p*-Peptid-Interaktion durch Sinken der Galactokinaseaktivität zu beobachten (Tabelle 3.2). Da NADP die Interaktion von *KlGal80p* mit dem *KlGal4p-AD22*-Peptid negativ beeinflusst, wird in Anwesenheit von NADP der inhibitorische Effekt von *NHKlGal80p* auf *KlGal1p* wieder stärker. Die Variante *NHKlGal80p-W31F*, welche kein NADP bindet (Abbildung 3.21), zeigte erwartungsgemäß keinen Einfluss von NADP auf die Peptid-Interaktion (Tabelle 3.2).

Bei Anwesenheit von *NHKlGal80p-SW* reduziert sich die Galactokinaseaktivität durch Zugabe von NADP in ähnlichem Maße wie beim Wildtyp. Trotz 80fach höherer Affinität für NADP ist der negative Einfluss des Liganden auf die *KlGal80p*-Peptid-Interaktion bei der *KlGal80p-SW*-Variante nicht stärker als beim Wildtyp, was darauf zurückzuführen ist, dass NADP in diesem Experiment in sättigender Konzentration vorlag.

### **3.3.4 Einfluss des N-terminalen K5A/R6A-Austauschs in *KlGal80p* auf die NADP-Bindung**

In *KlGal80p* liegen sowohl die Aminosäuren, welche einen Einfluss auf die Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* haben, als auch die NADP-Bindedomäne N-terminal.

Um auszuschließen, dass auch die N-terminale Doppelmutation *KlGal80-K5A/R6A* einen Einfluss auf die NADP-Bindung hat, wurde die Affinität durch Fluoreszenzspektroskopie (Abschnitt 2.4.1) gemessen. Hierzu wurde bis zu 1,6 mM NADP zu 1  $\mu$ M *KlGal80p* hinzutitriert. Die gemessene Affinität für NADP liegt für Wildtyp-NHK*KlGal80p* bei 277  $\mu$ M und für die NHK*KlGal80p-K5A/R6A*-Variante bei 232  $\mu$ M. Durch Zugabe des *KlGal4p-AD22*-Peptids (10  $\mu$ M) kommt es zu einer Konkurrenz der Bindung von NADP und des Peptids um *KlGal80p* und die Affinität für NADP sinkt (NHK*KlGal80p*:  $K_{D,app} = 460 \mu$ M, NHK*KlGal80p-K5A/R6A*:  $K_{D,app} = 403 \mu$ M).

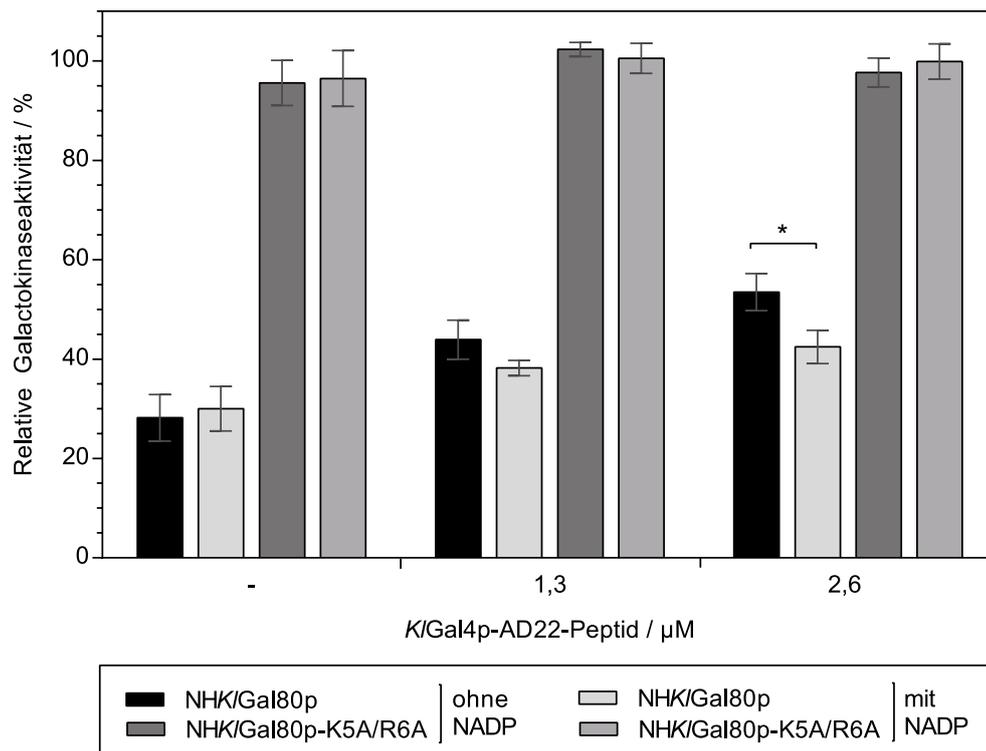


**Abbildung 3.25** Untersuchung der NADP-Affinität von *KlGal80p-K5A/R6A* mittels Fluoreszenzspektroskopie. Die relative Tryptophanfluoreszenz von aufgereinigtem NHK*KlGal80p* bzw. NHK*KlGal80p-K5A/R6A* (je 1  $\mu$ M) wurde in An- und Abwesenheit des *KlGal4p-AD22*-Peptids (10  $\mu$ M) und bei steigenden NADP-Konzentrationen gemessen. Der Messwert ohne NADP wurde für die Ermittlung der relativen Werte auf 1 gesetzt. Mittels Regression konnte die apparente Dissoziationskonstante der NHK*KlGal80p*-Variante und des Wildtyps ermittelt werden. Die Messung für NHK*KlGal80p-K5A/R6A* ohne Peptid basiert auf einer, alle übrigen Daten aus zwei unabhängigen Messungen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen NHK*KlGal80p*-Wildtyp und der NHK*KlGal80p-K5A/R6A*-Variante bezüglich der Affinität zu NADP und dem Einfluss des *KlGal4p*-Peptids auf diese Bindung gibt.

Dies kann auch im Galactokinase-Inhibierungsassay beobachtet werden (Abbildung

3.26). Dieser wurde wie in Abschnitt 3.2.6 jedoch in An- und Abwesenheit von 1 mM NADP im Puffer durchgeführt. In Anwesenheit von Wildtyp-NHKIGal80p, stört NADP die Interaktion mit dem *KIGal4p*-AD22-Peptid. Für *KIGal80p*-K5A/R6A kann wie erwartet hier kein Effekt beobachtet werden. Ebenso wenig ist die fehlende Störung der Galactokinasefunktion von *KIGal1p* durch die An- oder Abwesenheit von NADP beeinflusst.



**Abbildung 3.26 Messung der *KIGal80p*-bedingten Reduktion der Galactokinaseaktivität von *KIGal1p*.** Die relative Galactokinaseaktivität von *KIGal1p* (10 nM im Messansatz) wurde in An- und Abwesenheit des *KIGal4p*-AD22-Peptids und der angegebenen *KIGal80p*-Varianten (380 nM im Messansatz) gemessen und in Relation zur enzymatischen Aktivität von *KIGal1p* in Abwesenheit von *KIGal80p* gesetzt. Die Werte für Wildtyp-NHKIGal80p ohne *KIGal4p*-AD22-Peptid stammen aus vier, für Wildtyp-NHKIGal80p mit 2,6  $\mu\text{M}$  Peptid aus drei, für NHKIGal80p-K5A/R6A ohne Peptid aus zwei und die übrigen Werte aus einer Messung mit je 4 technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

## 4 DISKUSSION

---

Trotz ihrer gemeinsamen Funktion als Repressor des Transkriptionsaktivators Gal4p und ihrer hohen Sequenzübereinstimmung (58 % Übereinstimmung, 82 % Sequenzähnlichkeit) weisen die beiden Gal80p-Homologe aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* zahlreiche Unterschiede in Bezug auf Lokalisation, Interaktion mit den anderen regulatorischen Proteinen sowie Liganden auf. *KlGal80p* ist ein ausschließlich kernlokalisiertes Protein (Anders *et al.*, 2006), während *ScGal80p* in der gesamten Zelle vorzufinden ist. Welche Bedeutung dieser Lokalisationsunterschied für die Regulation der *GAL*-Gene in beiden Hefen hat, ist bisher ungeklärt. Innerhalb dieser Arbeit sollten die Ursache für den Lokalisationsunterschied sowie der Einfluss einer nicht kernlokalisierten *KlGal80p*-Variante auf den *GAL*-Schalter untersucht werden.

### 4.1 Identifizierung der N-terminalen Kernlokalisationssequenz in *KlGal80p*

Innerhalb meiner Diplomarbeit (Tews, 2009) untersuchte ich die Lokalisation verschiedener *KlGal80p*-Fragmente sowie -Varianten durch plasmidkodierte Überexpression als GFP-Fusionsprotein. Hierbei deutete sich eine Funktion des N-Terminus für die Kernlokalisierung an. Das kleinste im Kern lokalisierte *KlGal80p*-Fragment umfasste Aminosäure 2 bis 39 und das Fehlen dieser Aminosäuren führte zum Verlust der ausschließlichen Kernlokalisierung (Abbildung 3.3). Für *ScGal80p* wurden basierend auf Fluoreszenzmessungen mit überexprimierten und an LacZ fusionierten *ScGal80p*-Fragmenten bereits zwei NLS (Aminosäure 1 - 109; 342 - 405) beschrieben (Nogi und Fukasawa, 1989), hiervon liegt eine ebenfalls N-terminal. Dies deutet zunächst auf eine Konservierung der N-terminalen NLS hin. Da jedoch *ScGal80p* nicht wie *KlGal80p* ausschließlich kernlokalisiert vorliegt, muss es einen Unterschied in den Lokalisationssignalen geben. Innerhalb des *KlGal80p*-N-Terminus befindet sich die Sequenz  ${}^5\text{KR}^8\text{SK}_8$ , welche reich an basischen Aminosäuren ist und der Konsensussequenz einer klassischen einteiligen Kernlokalisationssequenz K-K/R-X-K/R (Chelsky *et al.*, 1989) entspricht. Der Aminosäureaustausch

K5A R6A in *KlGal80p* führt zu einer Störung der Kernlokalisierung (Tews, 2009). Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei tatsächlich um die NLS von *KlGal80p* handelt. Das Sequenzalignment (Abbildung 3.18) der Gal80p-Homologen verschiedener Hefespezies zeigt, dass Lysin 5 und Arginin 6 in den Gal80p-Homologen konserviert sind. Einen Hinweis auf einen Unterschied in der NLS von *KlGal80p* und *ScGal80p* liefert das Fehlen des Lysin an Position 8 in der N-terminalen Sequenz von *ScGal80p*. Dieses Lysin vervollständigt in *KlGal80p* die klassische NLS-Konsensussequenz (Abbildung 3.18) und ist lediglich in zwei weiteren Gal80p-Homologen konserviert. Innerhalb dieser Arbeit wurden weitere *KlGal80p*- und *ScGal80p*-Varianten konstruiert, welche Aufschluss über die dem Lokalisationsunterschied zugrunde liegende Sequenz liefern sollten. So führten die zum kleinsten, kernlokalisierten *KlGal80p*-Fragment (Aminosäure 2-39) korrespondierenden Aminosäuren in *ScGal80p* (Aminosäure 2-36) nicht zur Kernlokalisierung eines GFP-Fusionsproteins. Dies zeigte erneut, dass der Lokalisationsunterschied im N-Terminus beider Proteine begründet liegen könnte. Um dies zu bestätigen, wurden die N-terminalen 16 Aminosäuren in *ScGal80p* gegen jene aus *KlGal80p* ausgetauscht. Dies führte zu einer ausschließlichen Kernlokalisierung dieser *ScGal80p*-Variante. Damit bestätigte sich die Funktion der N-terminalen 16 Aminosäuren von *KlGal80p* als NLS und als verantwortlich für die ausschließliche Kernlokalisierung. Es bleibt zu prüfen, ob allein der Austausch des Serins an Position 8 gegen Lysin in *ScGal80p* ebenfalls zur ausschließlichen Kernlokalisierung führt.

Die Tatsache, dass das kleinste GFP-Fusionsprotein mit lediglich den 17 N-terminalen Aminosäuren von *KlGal80p* keine Kernlokalisierung zeigte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese kurze Peptidsequenz als Teil des Fusionsproteins nicht richtig exponiert war, um das GFP in den Kern zu transportieren.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass der Austausch der sogenannten Linker-Region (Aminosäuren 324-349 aus *ScGal80p* gegen Aminosäuren 325-365 in *KlGal80p*) in der *KlGal80p*-L-Variante ebenfalls zur Störung der Kernlokalisierung führt (Hager, 2003). Dies lässt zunächst zwei Erklärungen zu: In der Linker-Region von *KlGal80p* befindet sich eine weitere NLS, welche hier entfernt wurde, oder in der Linker-Region von *ScGal80p* ist eine NES, welche hinzugefügt wurde. Bemerkenswerterweise identifizierte die Suche nach einer NLS in *KlGal80p* mittels NLS-Mapper (Kosugi *et al.*, 2009a), neben der einteiligen N-terminalen NLS auch zwei weitere zweiteilige NLS, davon liegt eine (K<sub>326</sub> bis <sub>344</sub>KDKEKVTK<sub>351</sub>)

tatsächlich in der Linker-Region von *KlGal80p*. Die von mir in meiner Diplomarbeit und in dieser Arbeit untersuchten *KlGal80p*-Varianten zeigten jedoch, dass sowohl ein C-terminales *KlGal80p*-Fragment (Aminosäure 307-457), das *KlGal80p*-Fragment ohne die N-terminalen 39 Aminosäuren (*KlGal80p*-DC1) (Tews, 2009) als auch eine *ScGal80p*-Variante, in der die Linker-Region gegen jene aus *KlGal80p* ausgetauscht wurde, keine Kernlokalisierung aufwies. Dies spricht gegen eine zweite C-terminale NLS in *KlGal80p*. Gleichzeitig widerspricht dies auch einer NES in der Linker-Region von *ScGal80p*. Denn das Entfernen dieser NES in *ScGal80p* durch Einfügen der Linker-Region von *KlGal80p* hätte erwartungsgemäß zu einer verstärkten Kernlokalisierung dieser Variante führen müssen. Zudem bestätigt die Konstruktion einer *ScGal80p*-Variante mit den N-terminalen 16 Aminosäuren von *KlGal80p*, welche ausschließlich kernlokalisiert ist, dass selbst wenn eine NES in *ScGal80p* existiert, diese in ihrer Funktion nicht stärker ist als die N-terminale NLS aus *KlGal80p*. Auch konnte durch den Aminosäureaustausch zweier Leucine (L402A und L406A), welche Teil einer NES-Konsensussequenz sind, in *ScGal80p* keine NES bestätigt werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen daher zunächst nur die N-terminale NLS in *KlGal80p*, welche für den Lokalisationsunterschied zwischen *ScGal80p* und *KlGal80p* verantwortlich ist. Aus welchem Grund auch der Austausch der Linker-Region in *KlGal80p* zur Störung der Kernlokalisierung führt, kann durch die hier durchgeführten Analysen nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Lediglich ein kleiner Unterschied konnte zwischen der *ScGal80p*-Variante mit *KlGal80p*-N-Terminus und jener mit *KlGal80p*-N-Terminus und Linker-Region beobachtet werden. Die Transformanten mit erstgenannter Variante wuchsen deutlich schlechter und zeigten einen gewissen Selektionsdruck das Plasmid zu verlieren. Zudem zeigte die Variante mit N-Terminus- und Linker-Region-Austausch ein etwas stärkeres GFP-Signal als jene Variante, in der nur der N-Terminus ausgetauscht war. Nichtsdestotrotz war die Linker-Region von *KlGal80p* in den hier untersuchten Varianten weder nötig noch ausreichend, um eine ausschließliche Kernlokalisierung zu erzielen.

Für weitere Untersuchungen empfiehlt es sich, die *ScGal80p*-Varianten mit *KlGal80p*-N-Terminus bzw. -Linker-Region-Austausch chromosomal integriert zu exprimieren und die Lokalisation immunfluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Hierdurch könnten Dosiseffekte und ein Einfluss der GFP-Fusion ausgeschlossen werden. Zu-

dem bietet sich die Untersuchung der Regulation der *GAL*-Gene durch die kernlokalisierten *ScGal80p*-Varianten an.

## 4.2 Der Einfluss der Lokalisation von Gal80p auf die Regulation des *GAL*-Schalters

Drei Fragen bezüglich des Prinzips der *GAL*-Geninduktion werden seit Jahren kontrovers diskutiert: Stellt das Shutteln von *ScGal80p* zwischen Kern und Cytoplasma einen zentralen Mechanismus des *GAL*-Transkriptionsschalters dar? In welchem der zwei Kompartimente findet die für die Induktion nötige Interaktion von *ScGal80p* und *ScGal3p* statt? Bindet *ScGal3p* an freies oder *ScGal4p*-gebundenes *ScGal80p*?

### 4.2.1 Das Shutteln von *ScGal80p* ist nicht Induktionsprinzip in *S. cerevisiae*

Entgegen der lange postulierten Funktion des Shuttelns von *ScGal80p* als Prinzip der Induktion (Peng und Hopper, 2002) stellt ein weiteres Paper aus der selben Arbeitsgruppe diesen Mechanismus in Frage. Egriboz *et al.* (2011) zeigten, dass die Austauschrate von *ScGal80p* zwischen Kern und Cytoplasma zu langsam ist, um die schnelle Induktion der *GAL*-Gene damit zu erklären. Die ursprüngliche Hypothese stützte sich unter anderem auf die Daten von Nogi und Fukasawa (1989) und Peng und Hopper (2000). Hier wurden Lokalisationsstudien von *ScGal80p* und dessen Fragmenten durchgeführt sowie das Wandern von SV40-NLS-fusioniertem *ScGal80p* von einem Kern eines Heterokaryon zum anderen beobachtet. Diese Lokalisationsveränderung erfolgte jedoch erst nach mehreren Stunden. Daher deuten die Daten nicht auf einen schnellen Import durch die eigene NLS oder einen schnellen Export durch eine NES hin.

Ebenfalls deutet nichts auf einen schnellen Import von *ScGal3p* im Zuge der Induktion hin. Es konnte keine Umverteilung von Gal3p im Vergleich von nicht induzierten Zellen zu induzierten Zellen beobachtet werden. FRAP-Experimente in denen fluoreszenzmarkiertes *ScGal3p* im Kern mittels Laser gebleicht wurde, zeigten eine nur langsame Wiederherstellung des *ScGal3p* Signals im Kern (nach 10 Minuten). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Eintritt von *ScGal3p* in den Kern im Zuge der Induktion für die schnelle Induktion verantwortlich ist. Die aktuellsten Arbei-

ten deuten demnach nicht mehr auf eine Funktion des Shuttle-Prinzips von ScGal80p und ScGal3p als Prinzip der GAL-Gen-Induktion hin.

#### **4.2.2 Die in der Kernlokalisierung gestörte KlGal80p-K5A/R6A-Variante führt zu einem superreprimierten Phänotyp**

Für KlGal80p kommt ein *Shuttle*-Prinzip *per se* nicht in Frage. Dennoch stellt sich die Frage, wieso es einen Unterschied in der Lokalisation der Regulatoren in beiden Hefen gibt und welche mögliche Rolle dieser spielt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Stamm JA6/G80-KR56A, welcher die in der Kernlokalisierung gestörte KlGal80p-K5A/R6A-Variante exprimiert, konstruiert und phänotypisch untersucht. Der Stamm zeigte ein gestörtes Wachstum nach dem *Shift* von Glucose auf Galactose. Im X-Gal-Plattentest zeigt JA6/G80KR56A einen superreprimierten Phänotyp. Sowohl unter reprimierenden als auch induzierenden Bedingungen sind die Zellen weiß und damit reprimiert. Dies zeigt, dass der reprimierende Effekt von KlGal80p-K5A/R6A auf KlGal4p auch unter induzierenden Bedingungen nicht aufgehoben werden kann.

Dieser Phänotyp war zunächst unerwartet. Aufgrund der Verteilung von KlGal80p-K5A/R6A in der gesamten Zelle könnte man von einem geringeren Level des Repressors im Kern ausgehen. Daher würde von dem sonst kernlokalisierten Repressor, der nun in der gesamten Zelle verteilt ist, eine schwächere Repression erwartet werden. Der gegenteilige Phänotyp wurde jedoch beobachtet. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern die veränderte Lokalisation für den superreprimierten Phänotyp verantwortlich ist oder ob dies ein unabhängiger Effekt der Mutation ist.

#### **4.2.3 Die gestörte Kernlokalisierung von KlGal80p-K5A/R6A ist nicht ursächlich für den superreprimierten Phänotyp in JA6/G80-KR56A**

Eine Überlegung zur Erklärung dieses Phänotyps war ein Einfluss der KlGal80p-K5A/R6A-Variante auf KlGal1p. Es wurde bereits in einer früheren Arbeit (Anders *et al.*, 2006) ein Einfluss von KlGal80p auf die KlGal1p-Lokalisation festgestellt, welcher sich in Form einer Kernakkumulation von KlGal1p bei Überexpression von KlGal80p äußerte. Die Überexpression von KlGal80p-K5A/R6A zeigte jedoch nicht

diesen Effekt auf die *KlGal1p*-Lokalisation (Abbildung 3.9). Dies ließ vermuten, dass die nicht kernlokalisierte *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante *KlGal1p* im Cytoplasma zurückhält. Die damit verbundene geringere *KlGal1p*-Konzentration im Kern könnte den Induktionsprozess erschweren und den superreprimierten Phänotyp erklären. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden der Wildtypstamm (JA6/G80M) und die Doppelmutante (JA6/G80KR56A) mit Plasmiden transformiert, die N-terminal mit der NLS des „Simian-Virus 40 large T-Antigen“-Proteins (SV40-NLS) fusioniertes *KlGal1p* exprimierten. Dieses war wie erwartet im Kern lokalisiert, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Induktion des JA6/G80KR56A (Abbildung 3.11). Somit war es nicht der Mangel an kernlokalisiertem *KlGal1p*, welches den superreprimierten Phänotyp verursachte.

Als zusätzlicher direkter Nachweis, dass nicht die veränderte Lokalisation von *KlGal80p*-K5A/R6A für den superreprimierten Phänotyp verantwortlich ist, wurde durch N-terminale Fusion mit der SV40-NLS ein kernlokalisiertes *KlGal80p*-K5A/R6A (*KlGal80p*-SVKR) konstruiert. Die Kernlokalisation von *KlGal80p*-SVKR hatte keinen Einfluss auf den superreprimierten Phänotyp (Abbildung 3.13). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende ausschließliche Kernlokalisation von *KlGal80p*-K5A/R6A für den superreprimierten Phänotyp verantwortlich ist. Basierend auf den weiteren hier durchgeführten Experimenten ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung der Interaktion mit *KlGal1p* (Abschnitt 4.4.1) einen zweiten Effekt der N-terminalen Doppelmutation darstellt und den superreprimierten Phänotyp verursacht. Es war daher nicht möglich, eine Aussage über den Einfluss der veränderten Lokalisation von *KlGal80p* auf das Induktions- und Repressionsverhalten in *K. lactis* zu treffen.

Es lässt sich jedoch vermuten, dass die ausschließliche Kernlokalisation von *KlGal80p* von entscheidender Bedeutung für den *GAL-Switch* sein könnte. Da die Interaktion von *KlGal80p* mit *KlGal1p* die enzymatische Aktivität von *KlGal1p* hemmt, könnte durch eine ausschließliche Kernlokalisation von *KlGal80p* die Hemmung der enzymatischen Aktivität von *KlGal1p* im Cytoplasma verhindert werden. In *S. cerevisiae* spielt diese Trennung keine Rolle, da hier durch die Genduplikation die regulatorische und die enzymatische Funktion auf *ScGal1p* und *ScGal3p* aufgeteilt wurden. Für die Induktion durch *ScGal3p* ist keine Inhibierung der Kinasefunktion nötig, da es keine besitzt. Zudem ist die Affinität von *ScGal80p* für *ScGal1p* um Faktor 10 geringer als für *ScGal3p* (Lavy *et al.*, 2016). Daher spielt der negative Einfluss

von ScGal80p auf die Kinasefunktion im Cytoplasma in *S. cerevisiae* womöglich eine geringere Rolle, da ScGal80p hier vermutlich in erster Linie ScGal3p bindet.

### 4.3 Die Lokalisation von KlGal1p wird durch die KlGal80p-Lokalisation sowie -Interaktion beeinflusst

Innerhalb einer früheren Arbeit (Anders *et al.*, 2006) konnte ein Einfluss von KlGal80p auf die Lokalisation von KlGal1p beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass KlGal1p im Kern akkumuliert, wenn KlGal80p überexprimiert wird. Es ist bisher unklar, ob es sich bei diesem Effekt um einen Co-Transport beider Proteine in den Kern handelt. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression der in der gesamten Zelle verteilten KlGal80p-K5A/R6A-Variante nicht zu einer Akkumulation von KlGal1p im Kern führt (Abschnitt 3.2.2). Geht man von einem Co-Transport beider Proteine aus, so würde dies diesen Phänotyp erklären. Durch den gestörten Kerntransport von KlGal80p-K5A/R6A wird auch KlGal1p nicht in den Kern transportiert. Die Überexpression der KlGal80p-SVKR-Variante, welche den K5A/R6A-Austausch trägt und durch eine N-terminale SV40-NLS im Kern lokalisiert ist, führt zu einer Kernakkumulation von KlGal1p. Dies zeigt eine klare Abhängigkeit der KlGal1p-Lokalisation von der Lokalisation des überexprimierten KlGal80p bzw. dessen Varianten. Um zu prüfen, ob diese Co-Lokalisation von einer direkten Interaktion beider Proteine abhängig ist, wurde zudem der Einfluss der in der KlGal1p-Interaktion gestörten KlGal80p-S2-Variante auf die KlGal1p-Lokalisation untersucht. Bei Überexpression der bindungsgestörten KlGal80p-Variante war auch KlGal1p nicht mehr im Kern lokalisiert, obwohl die KlGal80p-S2-Variante ausschließlich kernlokalisiert war. Dies deutet darauf hin, dass eine Interaktion beider Proteine nötig ist, damit KlGal1p bei Überexpression von KlGal80p im Kern akkumuliert. Die Variante KlGal80p-K5A/R6A führt nur zu einer schwachen Inhibierung der Galactokinaseaktivität von KlGal1p, was ebenfalls auf eine beeinträchtigte Interaktion beider Proteine hinweist. Neueste *Crosslinking*-Experimente (persönliche Mitteilung Christian Günzel) und die Tatsache, dass die Galactokinaseinhibierung nicht vollständig aufgehoben ist, deuten jedoch darauf hin, dass KlGal80p-K5A/R6A noch mit KlGal1p interagiert. Bei dieser KlGal80p-Variante scheint die N-terminale Mutation also vorrangig die Inhibierung der Galactokinasefunktion von KlGal1p zu beeinträchtigen, nicht jedoch die vollständige Interaktion mit KlGal1p aufzuheben. Da die Lokali-

sation von *KlGal1p* eine klare Abhängigkeit von der Lokalisation von *KlGal80p*-K5A/R6A aufweist und beide Proteine noch interagieren, steht dies ebenfalls im Einklang mit einer interaktionsabhängigen Co-Lokalisation beider Proteine.

Da *KlGal80p* in einem *gal1*-Deletionsstamm weiterhin kernlokalisiert ist (Anders *et al.*, 2006), ist die Lokalisation von *KlGal80p* offenbar nicht von *KlGal1p* abhängig.

Grundsätzlich erscheint es logisch, dass ein Mechanismus besteht, der den Kernimport von *KlGal1p* reguliert, da *KlGal1p* neben der induzierenden Funktion im Kern eine zweite Funktion, nämlich die als Galactokinase, im Cytoplasma ausübt. In den *GAL*-Regulon-Simulationen von Pannala *et al.* (2010) werden nur 10 % von *KlGal1p* in den Kern transportiert, der Rest bleibt zur Ausübung seiner enzymatischen Funktion im Cytoplasma. Ein Mechanismus, nach dem der Kerntransport von *KlGal1p* über die *KlGal80p*-Konzentration und -Lokalisation gekoppelt ist, erscheint sinnvoll. Dieser würde gewährleisten, dass genügend *KlGal1p* im Kern ist, um unter induzierenden Bedingungen mit *KlGal80p* zu interagieren und die Induktion zu ermöglichen. Die Ergebnisse des Experiments mit überexprimiertem *KlGal80p* lassen sich durch einen Co-Transport erklären. Da *KlGal1p* normalerweise im Überschuss gegenüber *KlGal80p* vorliegt, führt die einfache Expression von *KlGal80p* nicht zu einer Kernakkumulation von *KlGal1p*, da nur ein Teil von *KlGal1p* mit *KlGal80p* interagiert. Durch Überexpression von *KlGal80p* gleichen sich die Konzentrationen an und das gesamte *KlGal1p* wird mit in den Kern transportiert.

Wie genau der Kerntransport von *KlGal80p* erfolgt, ist bisher nicht gezeigt. In *S. cerevisiae* sind 14 Importine der  $\beta$ -Karyopherin-Familie (Fiserova und Goldberg, 2010) und in *K. lactis* 13 für Karyopherine codierende Gene bekannt (Quan *et al.*, 2008). Über welches Karyopherin *KlGal80p* in den Kern transportiert wird, ist noch nicht erforscht. Da jedoch *KlGal80p* auch in *S. cerevisiae* kernlokalisiert und *ScGal80p* in *K. lactis* in der gesamten Zelle verteilt ist (Anders *et al.*, 2006), liegen die Gründe für die unterschiedliche Lokalisation in den Proteinen selbst und nicht im Vorhandensein verschiedener Karyopherine begründet.

### 4.3.1 Co-Transport funktionell verknüpfter Proteine

Auch andere funktionell verknüpfte Proteine werden gemeinsam in den Kern transportiert. Der Co-Transport kann über ein Adapterprotein erfolgen oder direkt durch

Heterodimerisierung. In *S. cerevisiae* werden die ribosomalen Proteine Rpl5 und Rpl11 über ein Adapterprotein (Symportin) Syo1 und Kap104 in den Kern transportiert (Bange *et al.*, 2014). Auch für die Histonvariante Htz1 und das Chaperon Nap1 ist ein Co-Import beschrieben (Straube *et al.*, 2010). Die Histondeacetylase 4 im Menschen (HDAC4) ist im Cytoplasma lokalisiert. Nur durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MEF2, welches eine NLS trägt, kommt es zum Kerntransport von HDAC4 (Borghini *et al.*, 2001). Der menschliche TATA-Box-Binde-Protein-assoziierte Faktor 10, TAF10, ist ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert und benötigt einen seiner drei Interaktionspartner: TAF3, TAF8 oder SPT7L, um in den Kern transportiert zu werden (Soutoglou *et al.*, 2005). Auch die Lokalisation des Homeodomänenproteins Prep1 ist von Pbx1, ebenfalls ein Homeodomänenprotein, abhängig (Berthelsen *et al.*, 1999). Neben diesen gelangen auch im Stoffwechsel involvierte Proteinpaare durch einen Co-Transport in den Kern, wie die humane Glucokinase GCK und dessen Regulator GCKR (Massa *et al.*, 2011). GCK selbst trägt keine NLS, wird jedoch über einen Huckepackmechanismus (*piggy-back*) durch GCKR in den Kern transportiert. Interessanterweise dissoziieren beide Proteine bei hohen Glucosekonzentrationen und GCK wird über eine eigene NES, die nun nicht mehr maskiert ist, ins Cytoplasma transportiert (Massa *et al.*, 2011). Hier ist die Lokalisation beider Proteine und der Co-Transport also zusätzlich kohlenstoffquellenabhängig reguliert.

Für *KlGal1p* ist bislang keine NLS oder NES beschrieben. Mittels online verfügbarer Software können jedoch Vorhersagen zu möglichen Lokalisationssignalen getroffen werden. Die Vorhersage einer NLS mittels NLS-Mapper (Kosugi *et al.*, 2009b) ergibt 4 mögliche zweiteilige NLS mit einem Score von 3,1 bis 4, was für ein nucleocytoplasmatisches Protein spricht. Die Vorhersage einer NES ergibt zwei unterschiedliche Ergebnisse: <sub>385</sub>LRVLKALQL<sub>393</sub> (NetNES, La Cour *et al.*, 2004), welche der Konsensussequenz LXXLXXLXL entspricht und <sub>323</sub>LNKMLQL<sub>329</sub> (ValidNESs, Fu *et al.*, 2011). Beide liegen nah beieinander, jedoch weit entfernt von der *KlGal80p*-Interaktionsstelle, wenn man für die Interaktion von *KlGal1p* mit *KlGal80p* eine ähnliche Interaktion annimmt wie jene von *ScGal3p* mit *ScGal80p*. Dies lässt eine Maskierung der NES von *KlGal1p* durch *KlGal80p*, welche bei fehlender Interaktion beider Proteine zu einem Rücktransport von *KlGal1p* ins Cytoplasma führt, unwahrscheinlich erscheinen.

## 4.4 Untersuchungen zur Interaktion des Repressors Gal80p mit den induzierenden Proteinen *KlGal1p* und *ScGal3p*

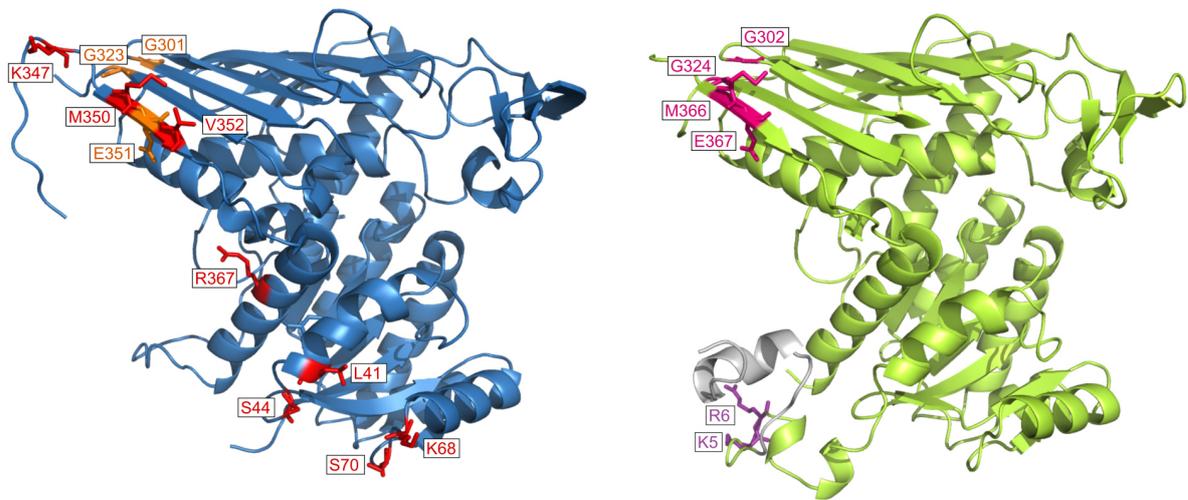
### 4.4.1 *KlGal80p*-K5A/R6A ist in der N-terminalen Interaktion mit *KlGal1p* gestört

Mit Hilfe des Galactokinase-Inhibierungsassay wurde gezeigt, dass der doppelte Aminosäureaustausch (K5A R6A) im N-Terminus von *KlGal80p* den inhibierenden Effekt von *KlGal80p* auf die Galactokinasefunktion von *KlGal1p* größtenteils aufhebt. Erst durch Titration sehr hoher *KlGal80p*-Mengen (bis 12  $\mu$ M) konnte eine Abnahme der Kinaseaktivität beobachtet werden. Der N-Terminus von *KlGal80p* scheint demnach eine Rolle in der Interaktion mit *KlGal1p* zu spielen. Diese Funktion des N-Terminus von *KlGal80p* ist bisher kaum dokumentiert. Zuvor beschriebene Mutationen (G302R und E367K), welche die *KlGal80p*-*KlGal1p*-Interaktion beeinflussen, lagen zentral (Abbildung 4.1) und die korrespondierenden Aminosäuren haben auch in *ScGal80p* einen Einfluss auf die *ScGal80p*-*ScGal3p*-Interaktion. Zudem konnten in der C-terminalen Region von *ScGal80p* direkte Interaktionsstellen mit *ScGal3p* in der Co-Kristallstruktur festgestellt werden (Lavy *et al.*, 2012). Menezes *et al.* (2003) zeigten jedoch auch, dass die Aminosäuren 267 bis 404 aus *KlGal80p* allein nicht ausreichen, um an *KlGal1p* zu binden.

Eine Rolle des N-Terminus von *KlGal80p* in der *KlGal1p*-Interaktion hat sich in vorherigen Experimenten bereits, wenn auch nicht durch bindungsdefiziente Varianten, durch den Einfluss von N-terminalen Epitopen angedeutet. Die *KlGal80p*-Variante mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag zeigte eine niedrigere Affinität für *KlGal1p* als jene, die einen internen Tag trug (Christian Klose, 2004; Anders *et al.*, 2006). Der Tag konnte durch Thrombin partiell entfernt werden, wobei noch zusätzliche neun Aminosäuren am N-Terminus verblieben. Auch diese Variante wies eine niedrigere Affinität für *KlGal1p* auf. Dies zeigt, dass bereits kleine Veränderungen des *KlGal80p*-N-Terminus die Interaktion mit *KlGal1p* negativ beeinflussen.

### 4.4.2 Die Rolle des N-Terminus von Gal80p im Zusammenhang mit der Gal1p/Gal3p-Interaktion

Für *KlGal80p*-*KlGal1p* liegt noch keine Co-Kristallstruktur vor, so dass nicht auf Strukturdaten zurückgegriffen werden kann, um zu beurteilen, ob eine Interaktion



**Abbildung 4.1** Kristallstrukturen von *ScGal80p* und *KlGal80p*. Dargestellt sind die Kristallstrukturen von *ScGal80p* in blau (pdb: 3V2U, Lavy *et al.*, 2012) und *KlGal80p* in grün (pdb: 2NVW, Thoden *et al.*, 2007). Die direkten Interaktionsstellen (Lavy *et al.*, 2012) von *ScGal80p* mit *ScGal3p* sind rot markiert. Die Aminosäureaustausche der Superrepressormutanten (G301R, G323R und E351K), welche in der *ScGal3p*-Bindung gestört sind, sind orange markiert. Die Austausch, welche die *KlGal80p*-*KlGal1p*-Interaktion verbessern (M366V), verringern (G324R) oder stören (G320R, E367K) sind pink, die N-terminalen Aminosäuren K5A und R6A violett markiert. Der N-terminale His-Tag in der *KlGal80p*-Struktur ist grau dargestellt.

des N-Terminus von *KlGal80p* mit *KlGal1p* möglich ist und mit welcher Region von *KlGal1p* die Interaktion stattfindet.

Für *ScGal80p*-*ScGal3p* liegt eine Co-Kristallstruktur vor, hier fehlen jedoch die N-terminalen 15 Aminosäuren von *ScGal80p*, genau wie in allen anderen Kristallstrukturen von *ScGal80p*, so dass auch aus dieser Struktur keine Aussage über die Lage und über die Interaktionsstellen des Gal80p-N-Terminus abgeleitet werden kann.

Die Kristallstruktur von *KlGal80p* enthält zwar den N-Terminus, allerdings wurde dieses Protein über einen N-terminalen His-Tag aufgereinigt, welcher ebenfalls in der Struktur dargestellt ist (Abbildung 4.1). Da der N-Terminus sehr flexibel ist (Upadhyay, 2014) und aufgrund des zusätzlichen Tags, ist fraglich, ob der N-Terminus von *KlGal80p* tatsächlich die in der Kristallstruktur dargestellte Konformation einnimmt. Es kann daher zur strukturbasierten Beurteilung einer möglichen Funktion des *KlGal80p*-N-Terminus in der *KlGal1p*-Interaktion nur auf die modellierten Daten von Upadhyay (2014) zurückgegriffen werden.

Upadhyay (2014) postuliert eine Beteiligung des N-Terminus von *ScGal80p* an der Interaktion mit *ScGal3p/ScGal1p*. Upadhyay und Sasidhar (2012) hatten bereits zuvor ein *Docking*-Modell für die Interaktion von *ScGal80p* mit *ScGal3p* erstellt, welches eine große Übereinstimmung mit der Co-Kristallstruktur von Lavy *et al.* (2012) aufwies. Für ihr Modell haben sie auf Basis der Kristallstruktur der *ScGal80p*-S2-Variante (Kumar *et al.*, 2008) die Struktur des Volllängen-Wildtyp-*ScGal80p* modelliert. Daher enthält ihr Modell auch die N-terminalen 14 Aminosäuren. In dieser modellierten Struktur ist der N-Terminus (Aminosäuren 1-15 und 33-45) von *ScGal80p* an der Interaktion mit *ScGal3p* sowie mit *ScGal1p* beteiligt (Upadhyay, 2014).

#### 4.4.3 Unterschiede zwischen *ScGal80p* und *KlGal80p* in den N-terminalen Interaktionsstellen mit dem induzierenden Protein

Zwar fehlen in der *ScGal80p-ScGal3p*-Co-Kristallstruktur die N-terminalen Aminosäuren von *ScGal80p*, dennoch ist hier gezeigt, dass vier etwas entfernter liegende N-terminale Aminosäuren (L41, S44, K68, S70, Lavy *et al.*, 2012) an der Interaktion beteiligt sind. Von diesen ist jedoch nur Serin 44 in *KlGal80p* konserviert. Im Gegensatz dazu sind von den weiteren fünf C-terminal gelegenen direkten *ScGal3p*-Interaktionsstellen in *ScGal80p* (K347, M350, E351, V352, R367) vier in *KlGal80p* konserviert (M350, E351, V352, R367). Das heißt während die C-terminalen Aminosäuren, die zur *ScGal80p-ScGal3p*-Bindung beitragen, in beiden *Gal80p*-Homologen konserviert sind, sind es die N-terminalen nicht. Die Unterschiede im N-Terminus beider *Gal80p*-Homologe bezüglich der Interaktion mit dem induzierenden Protein könnten die begrenzte Austauschbarkeit beider Proteine erklären. *ScGAL3* kann die fehlende Induzierbarkeit einer *Klgal1*-Deletion nicht komplementieren, es sei denn, *KlGal80p* wird gegen *ScGal80p* ausgetauscht (Zenke *et al.*, 1996), denn *ScGal3p* interagiert nur schwach mit *KlGal80p*.

Lavy *et al.* (2012) beschreiben, dass die Interaktion von *ScGal80p* und *ScGal3p* im C-terminalen Bereich beider Proteine fester verankert und stabilisiert ist. Lag während der Kristallisation nur eine geringe Konzentration an ATP und Galactose vor, interagierten die C-Termini noch immer während die N-Termini dissoziierten. Währenddessen ist *ScGal3p* in einem Konformationszustand zwischen der offenen und geschlossenen Konformation. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass

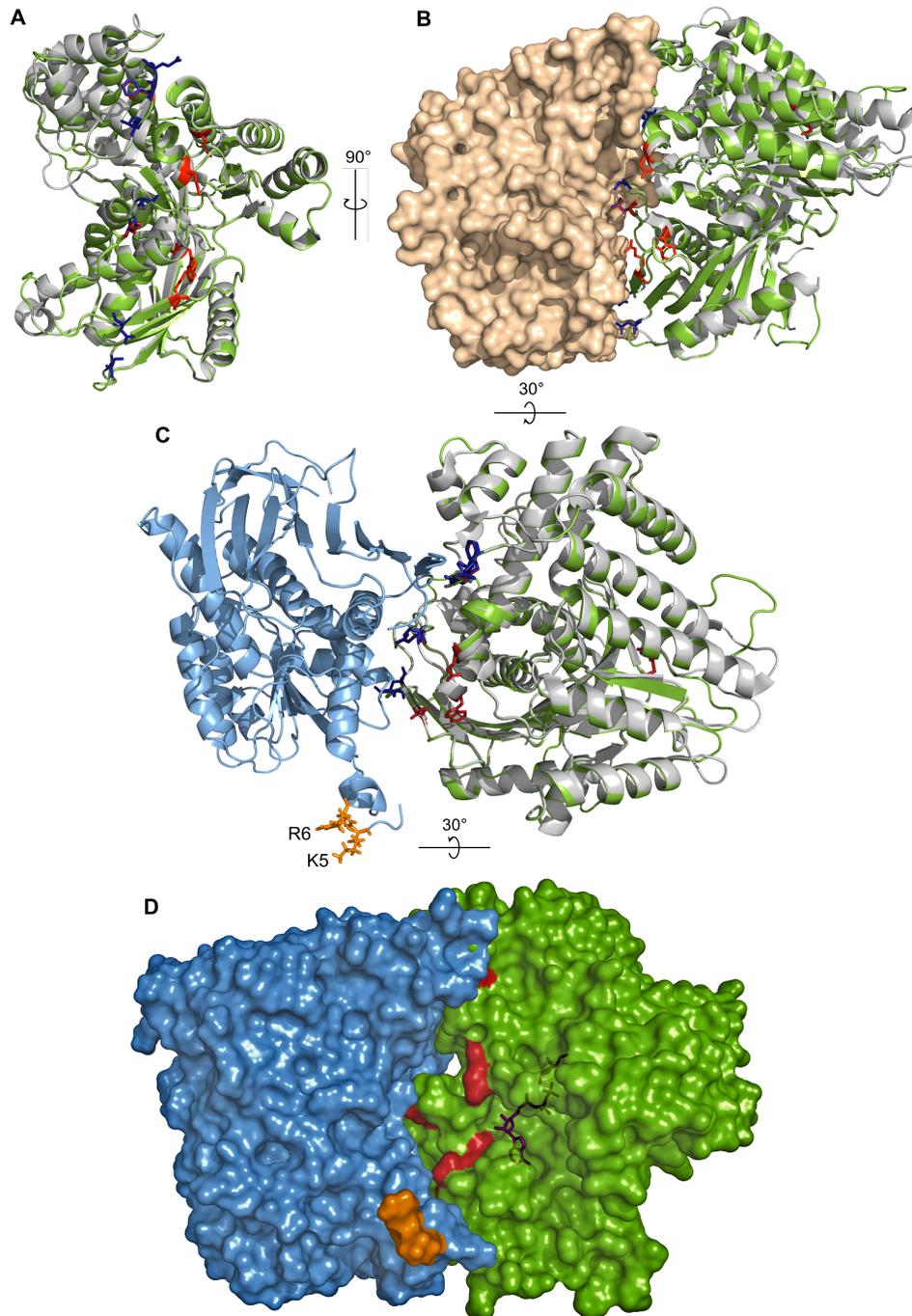
durch die C-terminale Region eine ligandenunabhängige Interaktion ermöglicht wird und dass es erst durch das Binden der Liganden an ScGal3p und die Einnahme der geschlossenen Konformation zur vollständigen Interaktion mit ScGal80p kommt. Diese Interaktion führt nach der Hypothese von Upadhyay (2014) zu einer Konformationsänderung von ScGal80p, welche schließlich das Loslösen von ScGal4p und damit die Induktion ermöglicht.

#### 4.4.4 Konservierung der ScGal80p/KlGal80p-Interaktionsstellen in ScGal3p und KlGal1p

Während die an der ScGal3p-Interaktion beteiligten Aminosäuren in ScGal80p nur teilweise in KlGal80p konserviert sind, sind die an der ScGal80p-Interaktion beteiligten Aminosäuren in ScGal3p (N82, D100, D111, S113, V375, F377 und Q378; Lavy *et al.*, 2012) auch in ScGal1p und KlGal1p konserviert. Der Austausch der zu ScGal3p-D111 und -F277 korrespondierenden Aminosäuren in KlGal1p (D108A und F368S, letztere als Doppelmutante mit M409S) führt zu einer Störung der Induktion (Menezes *et al.*, 2003). Es ist also davon auszugehen, dass diese Aminosäuren in KlGal1p ebenfalls an der KlGal80p-Interaktion beteiligt sind.

Zur Veranschaulichung der Lage dieser Aminosäureaustausche und aufgrund der fehlenden KlGal1p-KlGal80p-Co-Kristallstruktur wurde für KlGal1p ein Homologiemodell basierend auf der Struktur von ScGal3p mittels Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006) modelliert. Durch ein *Alignment* dieser sowie der vorhandenen KlGal80p-Struktur (pdb: 2NVW, Thoden *et al.*, 2007) mit der ScGal3p/ScGal80p-Co-Kristallstruktur (pdb: 3V2U, Lavy *et al.*, 2012) wurde ein hypothetisches Modell für die Interaktion von KlGal1p mit KlGal80p erhalten (Abbildung 4.2C und D).

In Abbildung 4.2 ist die Lage weiterer Aminosäuren in KlGal1p zu sehen, deren Austausch die regulatorische Funktion und damit verbunden auch die Interaktion mit KlGal80p stören: Gal1-m1 (E254K), Gal1-m2 (R94C) (Vollenbroich *et al.*, 1999) und Gal1-14 (W114R) (Menezes *et al.*, 2003) (Abbildung 4.2 rot markiert). Die Aminosäureaustausche dieser Varianten liegen auf der Seite des Proteins, welche zum N-Terminus von KlGal80p gewandt ist. Diese Aminosäuren sind in ScGal3p und ScGal1p konserviert; es liegen für diese beiden Proteine jedoch keine Daten zum Effekt dieser Austausch auf die ScGal80p-Interaktion vor, oder dazu, ob diese Aminosäuren speziell an der Interaktion von KlGal1p mit KlGal80p beteiligt sind.



**Abbildung 4.2 Strukturmodelle zur Interaktion von *Sc/KlGal80p* mit *ScGal3p/KlGal1p*.** (A) Strukturalignment von *ScGal3p* (hellgrau) und *KlGal1p* (grün). (B) Alignment von *ScGal3p* und *KlGal1p* mit *ScGal80p* (beige) bzw. (C) *KlGal80p* (hellblau). (D) Strukturmodell der Interaktion von *KlGal1p* und *KlGal80p*. Die Strukturen basieren auf der Co-Kristallstruktur von *ScGal3p* und *ScGal80p* (pdb: 3V2U, Lavy *et al.*, 2012) und der Kristallstruktur von *KlGal80p* (pdb: 2NVW, Thoden *et al.*, 2007). Die dargestellte *KlGal1p*-Struktur ist ein mittels Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) erstelltes Homologiemodell basierend auf dem *ScGal3p*-Template pdb: 3V2U 1D. Die Interaktion mit *KlGal80p* basiert auf einem Alignment mit *ScGal80p* in der *ScGal3p/ScGal80p*-Co-Kristallstruktur. Dunkelblau: direkte Interaktionsstellen von *ScGal3p* mit *ScGal80p*, rot markiert: *KlGal1p*-Aminosäureaustausche, die die *KlGal80p*-Interaktion stören (Vollenbroich *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2003), orange markiert: K5A R6A in *KlGal80p*, violett: ATP und Galactose.

In einer Studie über Fusionsproteine des *KlGal1p*-N-Terminus mit dem *ScGal3p*-C-Terminus und anders herum wurde gezeigt, dass für die Induktion in *K. lactis* sowohl N- als auch C-Terminus von *KlGal1p* erforderlich sind, damit der inhibitorische Effekt von *KlGal80p* auf *KlGal4p* aufgehoben wird (Vollenbroich *et al.*, 1999). Dies erklärt auch die fehlende Austauschbarkeit von *ScGal3p* mit *KlGal1p* in *K. lactis* (Zenke *et al.*, 1996). *ScGal80p* kann hingegen mit einem *KlGal1p-ScGal3p*-Fusionsprotein interagieren und die Zellen können induzieren. Auch andere Experimente haben gezeigt, dass *KlGAL1* in *S. cerevisiae* die fehlende Induzierbarkeit einer *Scgal3*-Deletion komplementiert (Meyer *et al.*, 1991). *ScGal80p* scheint also bezüglich der Interaktion mit dem induzierenden Protein weniger spezifisch als *KlGal80p*. Die Tatsache, dass die für *KlGal1p*, *ScGal1p* und *ScGal3p* beschriebenen Aminosäureaustausche, welche die Induktion bzw. die Gal80p-Interaktion stören, in den jeweils homologen Proteinen konserviert sind, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass Unterschiede im jeweiligen Gal80p und nicht im induzierenden Protein die Ursache für die begrenzte Austauschbarkeit der induzierenden Proteine sind.

#### 4.4.5 Modell zur Interaktion von *KlGal80p* und *KlGal1p*

Es gibt Hinweise darauf, dass im N-terminalen Bereich beider Gal80p-Homologe Unterschiede in der Interaktion mit dem jeweiligen induzierenden Protein zu finden sind: Die N-terminalen in *ScGal80p* an der direkten Interaktion mit *ScGal3p* beteiligten Aminosäuren sind in *KlGal80p* kaum konserviert und der N-terminale Aminosäureaustausch K5A R6A stört in *KlGal80p* die Induktion, hat in *ScGal80p* aber keinen derartigen Effekt. Basierend auf den hier durchgeführten Experimenten und anderen, veröffentlichten Arbeiten wurde nachfolgend zur Erklärung dieses superreprimierten Phänotyps und der Rolle des *KlGal80p*-N-Terminus für die Interaktion mit *KlGal1p* ein Modell aufgestellt.

##### 4.4.5.1 Erklärung des superreprimierten Phänotyps von JA6/G80-KR56A

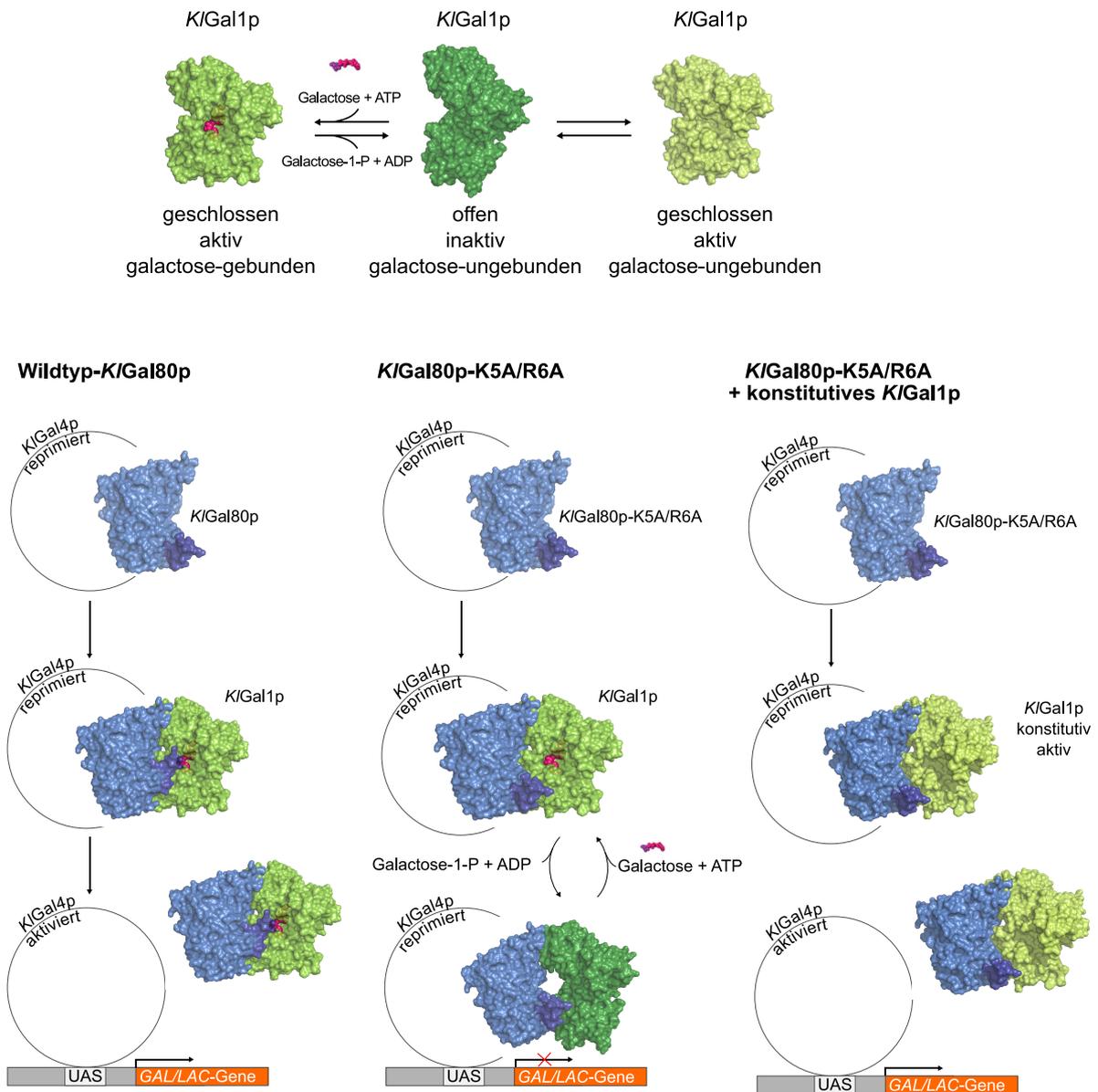
Basierend auf den Ergebnissen des Galactokinase-Inhibierungsexperiments lässt sich der superreprimierte Phänotyp der *KlGal80-K5A/R6A*-Mutante auf zwei Weisen erklären. Die Interaktion des *KlGal80p*-N-Terminus mit *KlGal1p* ist nötig, um durch

diese Interaktion eine Konformationsänderung von *KlGal80p* zu bewirken und dadurch *KlGal4p* zu aktivieren. Fehlt diese Interaktion bleibt *KlGal80p* an *KlGal4p* gebunden und die Mutante ist superreprimiert. Eine zweite Hypothese lautet folgendermaßen: Der N-Terminus von *KlGal80p* ist dazu nötig, das aktive Zentrum von *KlGal1p* zu verdecken und so das Freisetzen von Galactose oder Galactose-1-Phosphat zu verhindern. Hierdurch wird *KlGal1p* in seiner aktiven, galactosegebundenen Konformation stabilisiert, in der es so mit *KlGal80p* interagieren kann, dass dessen reprimierender Effekt auf *KlGal4p* aufgehoben wird (Abbildung 4.3).

Bei der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante ist diese Funktion des N-Terminus gestört, was dazu führt, dass *KlGal1p* nicht in seiner Kinasefunktion gestört wird und, wie der Galactokinase-Inhibierungsassay zeigt, enzymatisch aktiv ist. Die fehlende Inhibierung der enzymatischen Funktion von *KlGal1p* durch *KlGal80p*-K5A/R6A verhindert die Stabilisierung der aktiven Konformation von *KlGal1p*, wodurch *KlGal4p* nicht aktiviert werden kann. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass *KlGal80p*-K5A/R6A noch mit *KlGal1p* interagiert: Im Galactokinase-Inhibierungsassay ist die Inhibierung der Galactokinasefunktion nicht vollständig aufgehoben, eine interaktionsabhängige Co-Lokalisation beider Proteine ist zu beobachten und *Crosslinking*-Experimente legen ebenfalls eine Interaktion beider Proteine nahe (persönliche Mitteilung Christian Günzel).

Zenke *et al.* (1996) haben gezeigt, dass die *KlGal1p*-*KlGal80p*-Interaktion nur in Anwesenheit von Galactose und ATP erfolgt. Die Daten von Lavy *et al.* (2012) deuten jedoch auch darauf hin, dass eine C-terminale Interaktion von *ScGal80p* mit nicht ligandengebundenem *ScGal3p* möglich ist. Es wäre denkbar, dass mit *KlGal80p*-K5A/R6A interagierendes und enzymatisch aktives *KlGal1p* sofort nach dem Freisetzen von Galactose-1-Phosphat erneut Galactose bindet und die aktive, geschlossene Konformation einnimmt, dabei bleibt die C-terminale Interaktion womöglich kontinuierlich erhalten. Dieser ständige Wechsel zwischen offener und geschlossener Konformation von *KlGal1p* behindert möglicherweise eine Konformationsänderung von *KlGal80p*-K5A/R6A und verhindert die Aktivierung von *KlGal4p*. Ebenso ist es möglich, dass *KlGal1p* nach der Freisetzung von Galactose-1-Phosphat in der inaktiven Konformation vorliegt, von *KlGal80p*-K5A/R6A weg dissoziiert und *KlGal80p*-K5A/R6A sofort wieder mit galactosegebundenem *KlGal1p* interagiert. Das stetige Binden und Dissoziieren von *KlGal1p* verhindert in diesem Fall die Konformationsänderung von *KlGal80p*-K5A/R6A, welche einer stabilen Interaktion mit

*KlGal1p* bedarf. So bleibt *KlGal80p-K5A/R6A* trotz Interaktion mit *KlGal1p* dauerhaft an *KlGal4p* gebunden, was zum superreprimierten Phänotyp führt (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3 Modell zur Bedeutung des *KlGal80p*-N-Terminus für die *KlGal4p*-Aktivierung.** Das dargestellte, schematische Modell zeigt den Einfluss des *KlGal80p*-N-Terminus auf die Galactokinasefunktion und die Stabilisierung der aktiven Konformation von *KlGal1p* im Zuge der Induktion.

Betrachtet man das *KlGal80p-KlGal1p*-Strukturmodell (Abbildung 4.2D), so scheint der N-Terminus zunächst zu weit von *KlGal1p* entfernt, um das aktive Zentrum von *KlGal1p* zu blockieren. Es ist jedoch zu bedenken, dass der N-Terminus sehr

flexibel ist (Upadhyay, 2014) und für die Kristallisation mit einem N-terminalen His-Tag versehen war. Zudem basiert die gezeigte Struktur auf *KlGal80p*, welches ohne *KlGal1p* kristallisiert wurde, weshalb der N-Terminus hier möglicherweise nicht die selbe Konformation einnimmt, wie in einem Komplex mit *KlGal1p*. Wenn man den N-Terminus gedanklich in Richtung *KlGal1p* dreht, ist es denkbar, dass dieser das aktive Zentrum von *KlGal1p* blockiert.

Um zwischen beiden Hypothesen zu differenzieren, bietet es sich an, eine konstitutive *KlGal1p*-Variante, welche überwiegend in der aktiven Form vorliegt, mit der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante zusammen zu analysieren. Kann sie induzieren, so ist dies ein Hinweis darauf, dass die Induktion durch Wildtyp-*KlGal1p* der Stabilisierung der aktiven Konformation durch *KlGal80p* bedarf. Dies vermag *KlGal80p*-K5A/R6A nicht und *KlGal4p* kann deshalb nicht aktiviert werden. Bei einer konstitutiven *KlGal1p*-Variante, die überwiegend in der aktiven Konformation vorliegt, ist eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur aktiven Konformation durch die Liganden nicht nötig, weshalb diese *KlGal1p*-Variante auch in Anwesenheit der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante *KlGal4p* aktivieren kann (Abbildung 4.3). Dies würde auch Hypothese 1 widerlegen. Kann der reprimierende Effekt der in der N-terminalen Interaktion gestörten *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante durch eine konstitutive *KlGal1p* aufgehoben werden, so ist die N-terminale Interaktion beider Proteine nicht grundsätzlich für die Konformationsänderung von *KlGal80p* nötig, sondern lediglich für die Stabilisierung der aktiven Konformation von *KlGal1p*.

Wenn hingegen *KlGal4p* in Anwesenheit *KlGal80p*-K5A/R6A nicht durch eine konstitutive *KlGal1p*-Variante aktiviert werden kann, stützt dies die Hypothese, dass die N-terminale Interaktion für eine stabile *KlGal1p*-*KlGal80p* notwendig ist und nur bei intakter N-terminaler Interaktion eine Konformationsänderung von *KlGal80p* erfolgt, welche die Aktivierung von *KlGal4p* ermöglicht.

#### 4.4.5.2 Suppression des superreprimierten Phänotyps

Zur Analyse supprimierender *KlGal1p*-Varianten wurde zum Ende dieser Arbeit innerhalb eines Forschungsgruppenpraktikums eine Plasmid-Bibliothek (Abschnitt 2.2.13) mit zufällig durch PCR generierten Mutationen in *KlGAL1* erzeugt (persönliche Mitteilung Christian Günzel, Daten nicht gezeigt). Diese Plasmid-Bibliothek wurde in den Stamm JA6/G80-KR56A transformiert und nach solchen Transfor-

manten gescreent, welche auf galactosehaltigen Platten blau, also induziert, waren. Um auszuschließen, dass eine zusätzliche Mutation in *KlGal80-K5A/R6A* zur Induktion auf Galactose führt, wurden nur solche Transformanten weiter analysiert, die auf Glucose reprimierten. 352 von ca. 75.000 Transformanten (entspricht 0,47 %) induzierten auf Galactose. Aus den acht bislang untersuchten Transformanten wurden für sechs verschiedene *KlGal1p*-Varianten kodierende Plasmide isoliert. Die *KlGal1p*-Varianten enthielten einen oder mehrere Aminosäureaustausche. Ein Großteil der ausgetauschten Aminosäuren liegt, basierend auf dem hypothetischen Interaktionsmodell für *KlGal80p* und *KlGal1p* (Abbildung 4.2), weit vom *KlGal80p*-N-Terminus entfernt. Daher erscheint eine Suppression durch Wiederherstellen der Interaktion mit dem N-Terminus unwahrscheinlich.

Bemerkenswerterweise wurde in jeder der untersuchten *KlGal1p*-Varianten eine Aminosäure ausgetauscht, welche auch in zuvor beschriebenen konstitutiven *KlGal1p*-, *ScGal1p*- bzw. *ScGal3p*-Varianten mutiert war (Tabelle 4.1). Zwei der bereits beschriebenen Austausche führten in *KlGal1p* zur konstitutiven Aktivität von *KlGal4p* (*KlGal1p*-2C: G286F (Menezes *et al.*, 2003) und *KlGal1p*-d: E285K (Vollenbroich *et al.*, 1999)). Beide Varianten sind in der Kinasefunktion nicht beeinträchtigt (Vollenbroich *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2003). Zwei weitere Austausche, F233S sowie V387A, entsprachen den analogen Aminosäuren in *ScGal3p*- (F237Y, V396A) und *ScGal1p*-Varianten (F245Y), welche, wie in anderen Arbeiten gezeigt, ebenfalls einen konstitutiven Phänotyp verursachten (Blank *et al.*, 1997; Diep *et al.*, 2006; Sellick *et al.*, 2009). Mehrere Arbeiten deuten zudem darauf hin, dass die konstitutive Induktion durch die Variante *ScGal3p*-F237Y dadurch verursacht wird, dass sich diese überwiegend in der geschlossenen, aktiven Konformation befindet (Lavy *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2015). Der Austausch in *ScGal1p* (F245Y) störte zudem die Galactokinasefunktion (Sellick *et al.*, 2009).

Diese konstitutiven *KlGal1p*-Varianten sind vermutlich in der Lage, in Anwesenheit der *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante zu induzieren, da sie überwiegend in der aktiven Konformation vorliegen. Eine Stabilisierung der aktiven Konformation durch das Verhindern des Freisetzens von Galactose oder Galactose-1-Phosphat und der damit verbundenen Inhibierung der Kinasefunktion wäre bei diesen Varianten nicht nötig. Aufschluss darüber, ob lediglich konstitutive *KlGal1p*-Varianten supprimieren können, werden jedoch erst weitere Analysen der Varianten mit nur einem einzelnen Aminosäureaustausch liefern.

Basierend auf den supprimierenden *KlGal1p*-Varianten wird die zweite Hypothese, welche eine Inhibierung der *KlGal1p*-Kinasefunktion durch *KlGal80p* als Teil des Induktionsprinzips ansieht, hier favorisiert.

**Tabelle 4.1 *KlGal1p*-Suppressorvarianten.** Die durch *Random*-Mutagenese erzeugten *KlGal1p*-Varianten können den superreprimierten Phänotyp der *KlGal80-K5A/R6A*-Mutante supprimieren.

<i>KlGal1p</i> -Variante	Aminosäureaustausche
<i>KlGal1p</i> -T6	R33G <u>F233S</u> <sup>a</sup>
<i>KlGal1p</i> -T3	T74I <u>V387A</u> <sup>b</sup>
<i>KlGal1p</i> -G7	<u>G286D</u> <sup>c</sup>
<i>KlGal1p</i> -Ha	<u>F233S</u> <sup>a</sup> V267A
<i>KlGal1p</i> -D	F278L <u>E285G</u> <sup>d</sup> Y360H Q395R
<i>KlGal1p</i> -T10	K303R <u>V387A</u> <sup>b</sup>

<sup>a</sup> analoger AS-Austausch zu *ScGal3pc-311* (F237Y) (Blank *et al.*, 1997) und *ScGal1p*: (F245Y) (Sellick *et al.*, 2009)

<sup>b</sup> analoger AS-Austausch zu *ScGal3p-V396A* (Diep *et al.*, 2006) und *ScGal1p-V404A* (Sellick *et al.*, 2009)

<sup>c</sup> *KlGal1p-2C*: G286F (Menezes *et al.*, 2003)

<sup>d</sup> *KlGal1p-d*: E285K (Vollenbroich *et al.*, 1999).

Der superreprimierte Phänotyp einer *KlGal80-K5A/R6A*-Mutante konnte auch durch Überexpression von Wildtyp-*KlGal1p* supprimiert werden. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Die Überexpression von *KlGal1p* führt auch in Anwesenheit von Wildtyp-*KlGal80p* zu einer galactoseunabhängigen Induktion (Abbildung 3.16). Vollenbroich *et al.* (1999) interpretieren dies folgendermaßen: Das Gleichgewicht zwischen der aktiven (geschlossenen) und inaktiven (offenen) Konformation von *KlGal1p* verlagert sich durch Bindung von Galactose in Richtung der aktiven, geschlossenen Konformation. Doch auch in Abwesenheit von Galactose liegt bereits ein kleiner Teil in der aktiven Konformation vor (Abbildung 4.3). Durch Überexpres-

sion erhöht sich dieser Anteil und ermöglicht eine galactoseunabhängige Induktion. Die Suppression des superreprimierten Phänotyps von JA6/G80-KR56A durch Überexpression von *KlGal1p* lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass genügend *KlGal1p* galactose-ungebunden in der aktiven Konformation vorliegt, in welcher eine Stabilisierung der aktiven Konformation durch Verhindern der Freisetzung von Galactose oder Galactose-1-Phosphat durch den *KlGal80p*-N-Terminus nicht mehr nötig ist. Dadurch kann *KlGal4p* auch in Anwesenheit von *KlGal80p*-K5A/R6A aktiviert werden.

Auch die Überexpression der in der induzierenden Funktion gestörten *KlGal1p*-m1-Variante (E254K) führte zu einem supprimierenden Effekt. Für *KlGal1p*-m1 konnte im *Pulldown*-Experiment keine direkte Interaktion mit *KlGal80p* gezeigt werden (Zenke *et al.*, 1996). Vollenbroich *et al.* (1999) argumentieren, dass sich bei *KlGal1p*-m1 das Gleichgewicht in Anwesenheit von Galactose nicht in Richtung der aktiven Konformation verschiebt. Da diese Variante enzymatisch aktiv ist, ist sie offenbar in der Lage, Galactose zu binden. Womöglich ist die galactose-gebundene, aktive Konformation jedoch nicht stabil genug, um das Gleichgewicht in Richtung dieser Konformation zu verschieben. Eventuell wird *KlGal1p*-m1 durch eine gestörte *KlGal80p*-Interaktion nicht in der aktiven Konformation stabilisiert. Jedoch liegt, so Vollenbroich *et al.* (1999), wie auch beim Wildtyp ohne Galactose, ein kleiner Teil des Proteins galactose-ungebunden in der aktiven Form vor. Durch Überexpression ist dieser Anteil ausreichend hoch, um – wie auch Wildtyp-*KlGal1p* – *KlGal4p* in Anwesenheit von *KlGal80p*-K5A/R6A zu aktivieren. Zudem deutete eine vorläufige Messung der Interaktion von *KlGal1p*-m1 mit *KlGal80p*-K5A/R6A mittels Galactokinase-Inhibierungsassay nicht auf eine höhere Affinität von *KlGal80p*-K5A/R6A für diese Variante im Vergleich zu Wildtyp-*KlGal1p* hin (Daten nicht gezeigt). Dies bestärkt, dass der Suppressionseffekt nicht darauf beruht, dass die gestörte N-terminale Interaktion von *KlGal80p*-K5A/R6A mit Wildtyp-*KlGal1p* bei der *KlGal1p*-m1-Variante wieder hergestellt ist.

Die Variante *KlGal1p*-209 (N261Y) kann mit *KlGal80p* interagieren, ist jedoch in der Kinasefunktion gestört und supprimiert den superreprimierten Phänotyp der *KlGal80p*-K5A/R6A-Mutante nicht. Da diese *KlGal1p*-Variante in Anwesenheit von *KlGal80p* galactoseabhängig induzieren kann, ist davon auszugehen, dass sie Galactose bindet und in die aktive Konformation übergeht. Trotz der fehlenden Kinasefunktion scheint diese *KlGal1p*-Variante die Interaktion mit dem *KlGal80p*-N-

Terminus zu benötigen, um die galactose-gebundene, aktive Konformation zu stabilisieren, da sie ansonsten supprimieren würde. Die Überexpression von *KlGal1p-209* führt nicht zu einer schwachen Induktion auf Glucose, im Gegensatz zur Überexpression von Wildtyp-*KlGal1p* und der *KlGal1p-m1*-Variante (Abbildung 3.16). Daher scheint diese Variante nicht in der Lage zu sein, galactoseunabhängig in der aktiven Konformation vorzuliegen. Eine solche Variante des induzierenden Proteins ist auch in *S. cerevisiae* beschrieben. Die Variante *ScGal3p-IAD* (Dreifach-Aminosäureaustausch V273I, T404A und N450D) kann nur in Anwesenheit von Galactose nicht jedoch galactoseunabhängig durch Überexpression *ScGal4p* aktivieren (Kar *et al.*, 2015).

Da *KlGal1p-209* durch *KlGal80p-K5A/R6A* nicht in der galactose-gebundenen, aktiven Konformation stabilisiert wird und selbst nicht in einer galactose-ungebundenen, aktiven Konformation vorliegt, kann diese *KlGal1p*-Variante *KlGal4p* nicht in Anwesenheit von *KlGal80p-K5A/R6A* aktivieren.

#### 4.4.5.3 Übertragung des Interaktionsmodells auf *ScGal80p*

Auch für die Interaktion von *ScGal80p* und *ScGal1p* kann ein inhibierender Effekt auf die Kinasefunktion von *ScGal1p* beobachtet werden. Hier wird ebenfalls vermutet, dass *ScGal80p* die Bildung von Galactose-1-Phosphat oder dessen Freisetzung durch *ScGal1p* verhindert und so die Kinasefunktion stört (Sellick *et al.*, 2009).

Upadhyay (2014) postulieren, dass die N-terminalen 15 Aminosäuren von *ScGal80p* sowohl für die Interaktion mit *ScGal3p* als auch mit *ScGal1p* von Bedeutung sind. Allerdings zeigt ihr Modell auch, dass der N-Terminus von *ScGal80p* durch die Interaktion mit *ScGal1p* weniger flexibel ist als durch die Interaktion mit *ScGal3p*. Dies könnte dadurch interpretiert werden, dass der N-Terminus von *ScGal80p* eine stabilere Bindung mit *ScGal1p* eingeht, um die Kinasefunktion zu inhibieren. Da *ScGal3p* nicht enzymatisch aktiv ist, bleibt es gemäß den hier vorgestellten Modellvorstellungen in der aktiven Konformation ohne dass die Kinasefunktion durch *ScGal80p* inhibiert werden muss. Dies könnte auch erklären, warum der Austausch der Aminosäuren K5A R6A in *ScGal80p* nicht zu einem superreprimierten Phänotyp in *S. cerevisiae* führt. Bei der Interaktion von *ScGal80p* mit *ScGal3p* kommt der N-terminalen Interaktion im Zuge der Induktion möglicherweise eine geringere Bedeutung zu und *ScGal3p* kann *ScGal4p* aktivieren auch ohne die Interaktion mit

dem ScGal80p-N-Terminus. Dies würde auch die höhere Flexibilität des ScGal80p-N-Terminus im Komplex mit ScGal3p erklären (Upadhyay, 2014).

Wenn die Inhibierung der Kinasefunktion tatsächlich Voraussetzung für eine erfolgreiche Induktion ist, dann ist anzunehmen, dass dieser inhibitorische Effekt auch bei der Interaktion von ScGal80p mit KlGal1p erfolgt, da KlGal1p eine *Scgal3*-Deletion in *S. cerevisiae* supprimiert (Meyer *et al.*, 1991). Interessanterweise konnte KlGal80p nicht die Kinaseaktivität von ScGal1p inhibieren (Sellick *et al.*, 2009). Dies steht im Einklang damit, dass der reprimierende Effekt von KlGal80p auf KlGal4p in einem *KlGal1*-Deletionsstamm nicht durch ScGal1p aufgehoben werden kann (Zenke *et al.*, 1996).

#### 4.4.5.4 Zusammenhang zwischen N-terminaler NLS und Inhibierung der Galactokinasefunktion

Sowohl die NLS, welche für die Kernlokalisierung von KlGal80p und eventuell einen Co-Transport von KlGal1p verantwortlich ist, als auch die Region, die möglicherweise der Inhibierung der Galactokinasefunktion dient, liegen im N-Terminus von KlGal80p. Es stellt sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Überlappung. Ein gegenseitiges Ausschließen der jeweils anderen Funktion könnte die Ursache sein. Dies würde entweder eine Blockierung des Kerntransports durch die Interaktion des KlGal80p-N-Terminus mit KlGal1p oder die Beeinträchtigung der Galactokinaseinhibierung durch die Bindung eines Importins am KlGal80p-N-Terminus bedeuten.

Eine Interaktion von KlGal80p einschließlich seines N-Terminus mit KlGal1p könnte zu einer Maskierung der NLS führen. Dies würde jedoch den Kernimport von KlGal80p stören, wenn beide Proteine in Anwesenheit von Galactose interagieren. Da KlGal80p auch in Anwesenheit von Galactose kernlokalisiert ist, scheint diese Erklärung nicht sinnvoll.

Die Interaktion der NLS im KlGal80p-N-Terminus mit einem Importin könnte hingegen die Inhibierung der Galactokinasefunktion stören. Die Daten zu KlGal80p-K5A/R6A deuten darauf hin, dass diese Variante auch bei gestörter N-terminaler Interaktion noch mit KlGal1p interagiert. Es scheint daher möglich, dass auch das importingebundene KlGal80p noch mit KlGal1p interagiert und so ein Co-Import von KlGal1p mit KlGal80p erfolgt. Da der N-Terminus von KlGal80p in diesem Fall

durch das Importin gebunden wäre, ist davon auszugehen, dass die Galactokinasefunktion nicht inhibiert würde und *KlGal1p* noch enzymatisch aktiv wäre. Nach dem Freisetzen von Galactose-1-Phosphat bindet *KlGal1p* womöglich schnell wieder Galactose und bleibt dadurch in einer Konformation, die mit *KlGal80p* interagiert oder ligandenungebundenen *KlGal1p* dissoziiert von *KlGal80p* und wird durch galactose-gebundenes *KlGal1p* ersetzt.

Dieses Prinzip der Störung der Kinaseinhibierung durch das Binden eines Importins könnte der Trennung der beiden *KlGal1p*-Funktionen in Cytoplasma und Kern dienen. Es würde gewährleisten, dass die enzymatische Funktion von *KlGal1p* erst im Kern nach Dissociation des Importins durch den frei werdenden *KlGal80p*-N-Terminus inhibiert würde. Dort könnte *KlGal1p* dann seine Funktion als induzierendes Protein ausüben. Im Cytoplasma wäre *KlGal1p* hingegen bis zum Kernimport enzymatisch aktiv.

#### 4.5 Untersuchung des Einflusses von NAD(P) auf die Regulation der *GAL*-Gene

Neben den Unterschieden in ihrer Lokalisation und der Interaktion mit dem induzierenden Protein (*ScGal3p/KlGal1p*) unterscheiden sich *ScGal80p* und *KlGal80p* in der Affinität zu NAD(P). *ScGal80p* weist hierbei eine deutlich höhere Affinität für die Liganden auf als *KlGal80p*. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass NADP die Interaktion von Gal4p und Gal80p sowohl in *S. cerevisiae* als auch *K. lactis* stört (Li *et al.*, 2010b; Blüher *et al.*, 2014), während für NAD der Effekt auf die Gal4p-Interaktion für *KlGal80p* ebenfalls als negativ (Blüher *et al.*, 2014) doch für *ScGal80p* als positiv beschrieben ist (Li *et al.*, 2010b; Kumar *et al.*, 2008). Resultierend hieraus stellt sich die Frage, ob der die Gal4p-Gal80p-Interaktion störende Effekt von NADP auch *in vivo* eine Rolle im Induktionsprozess spielt und ob die Interaktion von Gal80p mit dem Liganden einen Sensor für den Redoxstatus der Zelle darstellt. Des Weiteren bleibt zu klären, warum sich die beiden Gal80p-Homologen so stark in den Affinitäten für NAD(P)/H unterscheiden, ob es Unterschiede bezüglich der intrazellulären Level von NAD(P)/H in *K. lactis* und *S. cerevisiae* gibt und wie sich diese bei wechselnden Kohlenstoffquellen verändern.

### 4.5.1 Die Mutation der NADP-Bindestelle in Gal80p zeigt pleiotrope Effekte auf den GAL-Regulationsschalter

Um den Einfluss der Dinukleotidbindung auf die Interaktion von *KlGal80p* und *KlGal4p* zu messen, wurden in dieser und vorangegangenen Arbeiten sowohl *ScGal80p*- als auch *KlGal80p*-Varianten mit geschwächter, gestörter oder erhöhter Dinukleotidaffinität konstruiert. Hierbei zeigte sich, dass der Austausch des Tryptophans 31 (W31A, W31G und W31F) in jedem Fall die Ligandenbindung stört. Das Tryptophan ist aufgrund von Stapelwechselwirkungen maßgeblich an der Interaktion mit dem Dinukleotid beteiligt (Blüher *et al.*, 2014). Trotz der gestörten Ligandenbindung in allen *KlGal80-W31*-Mutanten zeigen diese völlig unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit davon, ob es sich um *ScGal80p* oder *KlGal80p* handelt und welcher Austausch vorliegt. Während der Austausch W31G in *ScGal80p* im X-Gal-Plattentest zu einer geschwächten Repression auf Niedrigglucose führt (Schmidt, 2010; Hey, 2011), hat der W31A-Austausch in *ScGal80p* keinen negativen Effekt auf die Repression (Hey, 2011) und induziert vergleichbar mit dem Wildtyp (Kumar *et al.*, 2008). Der W31A-Austausch in *KlGal80p* hat hingegen eine massive Störung der Repression auf Glucose und eine erhöhte Induktion auf Galactose zur Folge (Abbildung 3.22 und 3.23). Beim W31F-Austausch in *KlGal80p* fällt dieser Effekt nur sehr schwach aus (Abbildung 3.22 und 3.23). Der Austausch des Tryptophans gegen das strukturell ähnliche Phenylalanin hat nur einen schwachen negativen Effekt auf die Repression (Abbildung 3.22, Blüher *et al.*, 2014) und einen leicht verstärkenden Effekt auf die Induktion (Abbildung 3.23). Da alle diese Gal80p-Varianten in der Dinukleotidbindung gestört sind, scheint nicht die gestörte Ligandenbindung, sondern eine Funktion dieser und der umliegenden Aminosäuren in der Interaktion mit Gal4p wahrscheinlich. Eine Störung der Gal4p-Interaktion ließe die geschwächte Repression erklären.

Interessanterweise hatte der Austausch der Aminosäuren 26 bis 38 aus *ScGal80p* gegen jene in *KlGal80p* (*KlGal80p*-SW) keinen Effekt auf die Repression oder Induktion, obwohl 8 der 13 ausgetauschten Aminosäuren nicht konserviert sind. Der Stamm JA6/G80-SW verhielt sich im X-Gal-Plattentest und im  $\beta$ -Galactosidase-Assay (Abbildungen 3.22 und 3.23) genau wie der Wildtyp. Die um Faktor 60 erhöhte Affinität zu NAD(P) (Blüher *et al.*, 2014) hatte in diesen Assays keine messbare Auswirkung auf Induktion oder Repression der *LAC*-Gene. Die starken Effekte von Punktmutata-

tionen in Gal80p auf die Interaktion mit Gal4p oder Gal1/3p machen es schwer, die Effekte der Dinukleotidbindung direkt zu untersuchen. Die *KlGal80p*-SW-Variante sowie die *KlGal80p*-W31F-Variante wären dennoch interessante Kandidaten, um mit anderen Messmethoden den Einfluss der Dinukleotidbindung auf die Induktion und Repression zu untersuchen. Diese beiden Varianten zeigten keine massive Störung der Repression, also scheint hier die Interaktion mit *KlGal4p* noch intakt. Blüher *et al.* (2014) haben gezeigt, dass durch Untersuchung mittels *Time-lapse*-Mikroskopie in Anwesenheit von Glucose und Galactose der *GAL*-Promotor abhängig von der NADP-Konzentration durch Wildtyp-*KlGal80p* reguliert wird. Für die in der NADP-Bindung gestörte *KlGal80p*-W31F ist hier wie zu erwarten keine Abhängigkeit zu beobachten.

Es gilt also sensiblere Messmethoden zu finden, die es ermöglichen, diese feine Stellschraube im *GAL*-Regulationsmechanismus genauer zu untersuchen.

#### 4.5.2 Intrazelluläre Konzentration von NAD(P)/H in *S. cerevisiae* und *K. lactis*

Aufgrund der unterschiedlichen Affinität von *ScGal80p* und *KlGal80p* für NAD(P), stellt sich auch die Frage nach den intrazellulären Konzentrationen der Dinukleotide. Es existieren in der Literatur verschiedene Daten zu den NAD(P)/H-Konzentrationen in *S. cerevisiae*, die sich jedoch genauso wie die Messmethoden, Stämme und Anzuchtbedingungen zum Teil stark unterscheiden. Die gemessenen Konzentrationen von NAD liegen zwischen 1 - 3 mM, die von NADH zwischen 0,04 - 1,42 mM (Theobald *et al.*, 1997; Canelas *et al.*, 2008; Sporty *et al.*, 2008). Die Konzentration von NADP/H in *S. cerevisiae* ist niedrig verglichen mit NAD/H (Ralser *et al.*, 2007) und liegt im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich (Gancedo und Gancedo, 1973; Yeast Metabolome Database: Jewison *et al.*, 2012). Die apparente Dissoziationskonstante für die Interaktion von *NHScGal80p* mit NAD beträgt 15,2  $\mu\text{M}$  und für NADP 2,5  $\mu\text{M}$  (Blüher *et al.*, 2014). Selbst wenn ein großer Teil von NAD(P) proteingebunden vorliegt, ist davon auszugehen, dass NAD(P) bezüglich *ScGal80p* in sättigender Konzentration vorliegt. Die Interaktion von *NHKlGal80p* mit NAD weist eine apparente Dissoziationskonstante von ungefähr 600  $\mu\text{M}$  und für NADP von ungefähr 120 – 210  $\mu\text{M}$  auf (Blüher *et al.*, 2014). Es liegen soweit bekannt keine Daten zur intrazellulären Konzentration von NAD(P) in *K. lactis* vor. Ähnelt sie den

Konzentrationen in *S. cerevisiae*, so wäre *KlGal80p* aufgrund der niedrigeren Affinität nicht mit NAD(P) gesättigt. Somit scheint es wahrscheinlicher, dass *KlGal80p*, jedoch nicht *ScGal80p*, als Sensor für sich verändernde NAD(P)-Level fungieren kann.

Meist wurde in den durchgeführten Messungen der intrazellulären NAD(P)-Konzentrationen nur der Gesamtgehalt an Dinukleotid bestimmt und nicht zwischen proteingebundenem und freiem NAD(P)/H differenziert. Wie Canelas *et al.* (2008) ermittelt haben, ist das Verhältnis des freien cytosolischen NAD zu NADH um mehr als Faktor 10 höher als das Gesamtverhältnis. Es liegt also ein kleinerer Teil des NAD in proteingebundener Form vor, als es bei NADH der Fall ist. Unter Niedrigglucosebedingungen verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von NAD, unter Hochglucose nimmt der Anteil an NADH zu. Während das Verhältnis von freiem NAD/NADH schwankt, bleibt das Gesamtzellverhältnis jedoch konstant (Canelas *et al.*, 2008). Da freies NAD gegenüber NADH deutlich überwiegt, sollten die Schwankungen von NADH größer sein bei Änderungen des Metabolismus, welche zur Bildung von NADH führen. Die Konzentration an freiem NADH spiegelt daher besser den metabolischen Zustand wider. Die Bindung von NADH durch einen Transkriptionsfaktor würde demnach einen sensitiveren Mechanismus darstellen, um Metabolismus und Transkription zu verbinden (Fjeld, 2003). Das Verhältnis von freiem, cytosolischen NADPH/NADP ist mit 15,6 beschrieben, auch hier ist das Gesamtzellverhältnis um Faktor 10 niedriger (Zhang *et al.*, 2015). Jedoch ist es hier die oxidierte Form, welche in größerem Maß proteingebunden vorliegt. Genau wie bei NAD/H verschiebt sich auch bei freiem, cytosolischen NADPH/NADP das Verhältnis bei Zugabe von Glucose hin zur reduzierten Form. Das Verhältnis von NADPH/NADP in der gesamten Zelle bleibt jedoch auch bei sich verändernden Glucosekonzentrationen konstant (Zhang *et al.*, 2015).

Basierend auf den Untersuchungen, die zeigen, dass NADP einen negativen Effekt auf die *KlGal80p-KlGal4p*-Interaktion hat (Blüher *et al.*, 2014), könnte man Folgendes vermuten. Bei Abnahme der Glucosekonzentration nimmt der Anteil an freiem NADP gegenüber NADPH zu. Die Interaktion von *KlGal80p* mit NADP stört die Interaktion mit *KlGal4p* und es kann so zur schnelleren Aufhebung des reprimierenden Effekts kommen und Gene zur Nutzung anderer Kohlenstoffquellen (Galactose, Lactose) können leichter aktiviert werden. *KlGal80p* zeigt jedoch nur eine um Faktor 6, *ScGal80p* um Faktor 3 höhere Affinität zu NADP als zu dessen reduzierter

Form. Dies Affinitätsunterschiede scheinen daher eher zu gering, als dass Gal80p als Redoxsensor fungieren könnte.

Die unterschiedliche Affinität für den Liganden von *ScGal80p* und *KlGal80p* könnte auch aus unterschiedlichen zellulären Konzentrationen der Metabolite resultieren, was aufgrund der unterschiedlichen Lebensweise denkbar wäre. Während in *S. cerevisiae* die Fermentation – sogar in Anwesenheit von Sauerstoff (Crabtree-positiv) – überwiegt, ist *K. lactis* vorwiegend auf Atmung ausgelegt (Crabtree-negativ) (González-Siso *et al.*, 2000). Dadurch unterscheiden sich beide Hefen auch in ihrem Redoxmetabolismus. Durch die vermehrte Atmung muss *K. lactis* oxidativen Stress reduzieren. *K. lactis* verstoffwechselt Glucose in einem höheren Maße durch den Pentosephosphatweg (PPP) (Jacoby *et al.*, 1993). Hierdurch wird NADPH bereitgestellt, welches als Redox-Cofaktor für antioxidierende Enzyme zum Schutz vor ROS dient (Pollak *et al.*, 2007). Der verstärkte Stoffwechsel über den PPP dient als Schutz vor oxidativem Stress durch die vermehrte Bildung von NADPH (Ralser *et al.*, 2007). Möglich wird der höhere Glucosefluss über den PPP in *K. lactis* durch die Fähigkeit zur Oxidation von NADPH mit Hilfe der mitochondrialen externen alternativen Dehydrogenasen (NDE), welche in *K. lactis* sowohl NADPH als auch NADH oxidieren können (González Siso *et al.*, 1996a; Tarrío *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* sind die Dehydrogenasen NADH-spezifisch. Zudem werden die NDEs in *S. cerevisiae* bei hohen Glucosekonzentrationen reprimiert (DeRisi *et al.*, 1997), dies führt zur stärkeren Oxidation von NADH durch Alkoholdehydrogenasen, was den Stoffwechsel in Richtung aerobe Fermentation treibt (Luttik *et al.*, 1998; González Siso und Cerdán, 2012). In *K. lactis* kommt es nicht zur kohlenstoffquellenabhängigen Regulation der NDES. Diese Unterschiede in der Lebensweise beider Hefen könnten auch für unterschiedliche NAD(P)-Level verantwortlich sein, welche wiederum die Ursache für die unterschiedliche Affinität von Gal80p für den Liganden in beiden Hefen sein könnte.

#### **4.5.3 Der Einfluss des Stoffwechsels und seiner Intermediate auf die Gentranskription in verschiedenen Spezies**

Es gibt eine Reihe von Transkriptionsregulatoren in *S. cerevisiae*, welche Metabolite binden und so Stoffwechselwege aktivieren, hierzu zählt beispielsweise Gal3p sowie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren: das Arginin bindende Arg81 (Messenguy

und Dubois, 2000), Prolin bindendes Put3p, Orotsäure bindendes Ppr1p und Häm bindendes Hap1p (Review: Campbell *et al.*, 2008).

Regulatoren, welche auf den Redoxzustand der Zelle reagieren, sind in der Literatur ebenfalls beschrieben. In Gram-positiven Bakterien ist der Transkriptionsfaktor Rex beschrieben, welcher abhängig vom intrazellulären Redoxzustand einen negativen Einfluss auf die Expression von Genen des Energiemetabolismus hat (Ravcheev *et al.*, 2012). Im Menschen zeigen eine Reihe von regulatorischen Proteinen eine NAD(P)-abhängige Aktivität: NmrA, HSCARG, CC3 und CtBP (Zheng *et al.*, 2007). Ein Beispiel für den Einfluss des Redoxzustands der Zelle auf die Genexpression in *S. cerevisiae* liefert Sir2, eine NAD-abhängige Histon-Deacetylase, welche transkriptionales *Silencing* und damit eine Repression der Transkription bewirkt (Review: Wierman und Smith, 2014).

Ob jedoch die Regulation der *GAL*-Gene vom Redoxzustand der Zelle beeinflusst wird oder ob die Bindung von Dinukleotiden durch Gal80p nur ein Überbleibsel der Abstammung von einer Glucose-Fructose-Oxidoreduktase darstellt (Aravind und Koonin, 1998), wird erst durch weitere Forschung gezeigt werden müssen.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Das *GAL*-Regulon ist sowohl in der Industrie als auch der Wissenschaft ein in vielen Anwendungen genutzter Transkriptionsschalter. Gerade das Wissen über die Details dieses viel untersuchten und noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus kann dazu dienen, diese Anwendungen zu optimieren.

Innerhalb dieser Arbeit sollten einige der noch offenen Fragen zur Funktionsweise des *GAL*-Schalters analysiert werden. Hierzu wurde in erster Linie *KlGal80p*, der Repressor der *GAL/LAC*-Gene in *K.lactis*, intensiv untersucht. Dabei galt ein besonderes Augenmerk den zahlreichen Unterschieden, die es vom Repressor *ScGal80p* in *S. cerevisiae* unterscheidet: die Lokalisation, die Interaktion mit dem Galactosesensor und die Ligandenbindung.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Kernlokalisationssequenz von *KlGal80p* innerhalb der N-terminalen 16 Aminosäuren liegt. Das in der gesamten Zelle lokalisierte *ScGal80p* ist nach Austausch der N-terminalen 16 Aminosäuren gegen jene aus *KlGal80p* ebenfalls ausschließlich kernlokalisiert. Damit wurde hier gezeigt, dass der Sequenzunterschied innerhalb dieser Region für den Lokalisationsunterschied zwischen *ScGal80p* und *KlGal80p* verantwortlich ist.

Aus den Untersuchungen einer in der Kernlokalisierung gestörten *KlGal80p*-Variante sollten Rückschlüsse über den Einfluss der Kernlokalisierung des Repressors *KlGal80p* auf den *GAL*-Regulationsmechanismus gezogen werden. Es war zunächst davon auszugehen, dass die Verteilung von *KlGal80p* in der gesamten Zelle zu einem reduzierten *KlGal80p*-Level im Kern und damit einhergehend zu einer schwächeren Repression führt. Die in der NLS mutierte Variante *KlGal80p*-K5A/R6A zeigte hingegen einen superreprimierten Phänotyp sowie verzögertes Wachstum auf Galactose. Durch verschiedene Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Phänotyp durch die mutationsbedingt veränderte Lokalisation verursacht wird. Stattdessen führte die Analyse dieser Variante zu einem weiteren Phänotyp: Die Mutation des N-Terminus von *KlGal80p* führt zu einer Störung der Interaktion mit *KlGal1p*. Im Gegensatz zu Wildtyp-*KlGal80p* stört die *KlGal80p*-K5A/R6A-Variante die Galactokinaseaktivität von *KlGal1p* kaum. Dies ist die erste beschriebene N-

terminale Mutation in *KlGal80p*, welche die Interaktion mit *KlGal1p* beeinflusst.

Die Ergebnisse weisen außerdem auf eine Abhängigkeit der Lokalisation von *KlGal1p* von der *KlGal80p*-Lokalisation sowie eine Abhängigkeit dieser Co-Lokalisation von der Interaktion beider Proteine hin.

Basierend auf den durchgeführten Untersuchungen wurde ein neues Modell für den Mechanismus der Induktion in *K. lactis* aufgestellt. Nach diesem Modell ist die Inhibierung der Galactokinasefunktion von *KlGal1p* durch *KlGal80p* notwendig, um den Umsatz von Galactose in Galactose-1-Phosphat zu verhindern und so *KlGal1p* in der aktiven, galactose-gebundenen Konformation zu stabilisieren. In dieser stabilen, aktiven Konformation interagiert *KlGal1p* verstärkt mit *KlGal80p*, sodass der reprimierende Effekt von *KlGal80p* auf *KlGal4p* aufgehoben wird. Der inhibitorische Effekt von *KlGal80p* auf die Kinasefunktion macht möglicherweise auch die ausschließliche Kernlokalisierung von *KlGal80p* notwendig, damit die enzymatische Funktion von *KlGal1p* im Cytoplasma nicht gestört wird. Die Inhibierung der Kinasefunktion als Prinzip der Induktion ist in *K. lactis* möglicherweise aufgrund der Bifunktionalität von *KlGal1p* notwendig und spielt ob der fehlenden enzymatischen Funktion von *ScGal3p* für dessen Interaktion mit *ScGal80p* keine Rolle.

Die Bindung von NAD(P) erfolgt ebenfalls N-terminal, überlappt jedoch nicht mit der Region, welche die NLS trägt und für die Inhibierung der Galactokinasefunktion verantwortlich scheint. Die Analyse von in der NAD(P)-Bindung beeinflussten *KlGal80p*-Varianten ergab teilweise starke Auswirkungen auf die Regulation der *GAL/LAC*-Gene. Diese waren in erster Linie auf eine Beeinflussung der Interaktion mit *KlGal4p* zurückzuführen. Die Frage nach der biologischen Funktion der Bindung des Dinukleotids durch *KlGal80p* und der Ursache der unterschiedlich hohen Affinität von *ScGal80p* und *KlGal80p* für den Liganden konnte hier nicht geklärt werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen führen zu der Erkenntnis, dass allein der N-Terminus von *KlGal80p* eine Fülle funktioneller Regionen aufweist, welche sowohl Lokalisation, Interaktion als auch Regulation des Repressors steuern. Teilweise überlappen diese funktionellen Regionen und es bleibt zu klären, ob dies eine biologische Funktion hat. Zudem ergab diese Arbeit ein neues Modell zum Mechanismus der Induktion, dessen experimentelle Bestätigung Aufgabe zukünftiger Forschungen sein wird.

# LITERATUR

---

- ABRAMCZYK, D., S. HOLDEN, C. J. PAGE und R. J. REECE (2012). „Interplay of a Ligand Sensor and an Enzyme in Controlling Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL Genes“. In: *Eukaryotic cell* 11.3, S. 334–342.
- AKADA, R., M. KAWAHATA und Y. NISHIZAWA (2000). „Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast“. In: *BioTechniques* 28.5, S. 854–856.
- 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.
- ANDERS, A., H. LILIE, K. FRANKE, L. KAPP, J. STELLING, E. GILLES und K. BREUNIG (2006). „The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding“. In: *The Journal of biological chemistry* 281.39, S. 29337–29348.
- ARAVIND, L. und E. V. KOONIN (1998). „Eukaryotic transcription regulators derive from ancient enzymatic domains“. In: *Current biology : CB* 8.4, R111–3.
- ARNOLD, K., L. BORDOLI, J. KOPP und T. SCHWEDE (2006). „The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling“. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 22.2, S. 195–201.
- ATKIN, A. L. (1998). „Preparation of Yeast Cells for Confocal Microscopy“. In: *Confocal Microscopy*. Hrsg. von S. W. PADDOCK. Bd. 122. New Jersey: Humana Press, S. 131–140.
- BANGE, G., G. MURAT, I. SINNING, E. HURT und D. KRESSLER (2014). „New twist to nuclear import: When two travel together“. In: *Communicative & Integrative Biology* 6.4, e24792.
- BEITZ, E. (2000). „TeXshade: Shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e“. In: *Bioinformatics* 16.2, S. 135–139.
- BERTANI, G. (1951). „Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*“. In: *Journal of bacteriology* 62.3, S. 293–300.
- BERTHELSEN, J., C. KILSTRUP-NIELSEN, F. BLASI, F. MAVILIO und V. ZAPPAVIGNA (1999). „The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear im-

- port and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH". In: *Genes & Development* 13.8, S. 946–953.
- BHAT, P. J. und J. E. HOPPER (1991). „The mechanism of inducer formation in gal3 mutants of the yeast galactose system is independent of normal galactose metabolism and mitochondrial respiratory function". In: *Genetics* 128.2, S. 233–239.
- BHAT, P. J., D. OH und J. E. HOPPER (1990). „Analysis of the GAL3 signal transduction pathway activating GAL4 protein-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*". In: *Genetics* 125.2, S. 281–291.
- BHAUMIK, S., T. RAHA, D. AIELLO und M. GREEN (2004). „In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer". In: *Genes & Development* 18.3, S. 333–343.
- BIANCHI, M. M., C. FALCONE, C. X. RE, M. WÉSŁOWSKI-LOUVEL, L. FRONTALI und H. FUKUHARA (1987). „Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 \upmum circular plasmid pKD1". In: *Current genetics* 12.3, S. 185–192.
- BLANK, T. E., M. P. WOODS, C. M. LEBO, P. XIN und J. E. HOPPER (1997). „Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*". In: *Molecular and cellular biology* 17.5, S. 2566–2575.
- BLÜHER, D., A. REINHARDT-TEWS, M. HEY, H. LILIE, R. GOLBIK, K. D. BREUNIG und A. ANDERS (2014). „An ancient oxidoreductase making differential use of its co-factors". In: *Biological chemistry* 395.7-8, S. 855–869.
- BORGHI, S., S. MOLINARI, G. RAZZINI, F. PARISE, R. BATTINI und S. FERRARI (2001). „The nuclear localization domain of the MEF2 family of transcription factors shows member-specific features and mediates the nuclear import of histone deacetylase 4". In: *Journal of cell science* 114.Pt 24, S. 4477–4483.
- BRAM, R. J. und R. D. KORNBERG (1985). „Specific protein binding to far upstream activating sequences in polymerase II promoters". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.1, S. 43–47.
- BREUNIG, K. D. und P. KUGER (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". In: *Molecular and cellular biology* 7.12, S. 4400–4406.

- BURKHOLDER, P. R. (1943). „Vitamin deficiencies in yeasts“. In: *Amer. J. Bot.* 30:206–211.
- CAMPBELL, R., M. LEVERENTZ, L. RYAN und R. REECE (2008). „Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *The Biochemical journal* 414.2, S. 177–187.
- CANELAS, A. B., W. M. VAN GULIK und J. J. HEIJNEN (2008). „Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions“. In: *Biotechnology and bioengineering* 100.4, S. 734–743.
- CAPUTTO, R., L. F. LOIRO, R. E. TRUCCO, C. E. CARDINI und A. C. PALADINI (1949). „The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives“. In: *The Journal of biological chemistry* 179.1, S. 497.
- CARDINI, C. E. und L. F. LOIRO (1953). „Enzymic phosphorylation of galactosamine and galactose“. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 45.1, S. 55–64.
- CAREY, M., H. KAKIDANI, J. LEATHERWOOD, F. MOSTASHARI und M. PTASHNE (1989). „An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer“. In: *Journal of molecular biology* 209.3, S. 423–432.
- CHASMAN, D. I. und R. D. KORNBERG (1990). „GAL4 protein: purification, association with GAL80 protein, and conserved domain structure“. In: *Molecular and cellular biology* 10.6, S. 2916–2923.
- CHELSKY, D., R. RALPH und G. JONAK (1989). „Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus“. In: *Molecular and cellular biology* 9.6, S. 2487–2492.
- CHRISTIAN KLOSE (2004). *Struktur- und Funktionsanalyse des Gal4-Inhibitors Gal80*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- CZYZ, M., M. M. NAGIEC und R. C. DICKSON (1993). „Autoregulation of GAL4 transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose“. In: *Nucleic acids research* 21.18, S. 4378–4382.
- DAY, R. N. und M. W. DAVIDSON (2009). „The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging“. In: *Chemical Society Reviews* 38.10, S. 2887.
- DERISI, J. L., V. R. IYER und P. O. BROWN (1997). „Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale“. In: *Science (New York, N.Y.)* 278.5338, S. 680–686.

- DIEP, C. Q., G. PENG, M. BEWLEY, V. PILAURI, I. ROPSON und J. E. HOPPER (2006). „Intragenic suppression of Gal3C interaction with Gal80 in the *Saccharomyces cerevisiae* GAL gene switch“. In: *Genetics* 172.1, S. 77–87.
- DIEP, C., X. TAO, V. PILAURI, M. LOSIEWICZ, T. BLANK und J. HOPPER (2008). „Genetic evidence for sites of interaction between the Gal3 and Gal80 proteins of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL gene switch“. In: *Genetics* 178.2, S. 725–736.
- DOUGLAS, H. C. und C. D. HAWTHORNE (1972). „Uninducible mutants in the gal i locus of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Journal of bacteriology* 109.3, S. 1139–1143.
- EGRIBOZ, O., S. GOSWAMI, X. TAO, K. DOTTS, C. SCHAEFFER, V. PILAURI und J. E. HOPPER (2013). „Self-Association of the Gal4 Inhibitor Protein Gal80 Is Impaired by Gal3: Evidence for a New Mechanism in the GAL Gene Switch“. In: *Molecular and cellular biology* 33.18, S. 3667–3674.
- EGRIBOZ, O., F. JIANG und J. HOPPER (2011). „Rapid GAL gene switch of *Saccharomyces cerevisiae* depends on nuclear Gal3, not nucleocytoplasmic trafficking of Gal3 and Gal80“. In: *Genetics* 189.3, S. 825–836.
- FISEROVA, J. und M. W. GOLDBERG (2010). „Nucleocytoplasmic transport in yeast: a few roles for many actors“. In: *Biochemical Society Transactions* 38.1, S. 273.
- FJELD, C. C. (2003). „Differential binding of NAD<sup>+</sup> and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.16, S. 9202–9207.
- FREY, P. A. (1996). „The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose“. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10.4, S. 461–470.
- FU, S.-C., K. IMAI und P. HORTON (2011). „Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential“. In: *Nucleic acids research* 39.16, e111.
- GANCEDO, J. M. und C. GANCEDO (1973). „Concentrations of intermediary metabolites in yeast“. In: *Biochimie* 55.2, S. 205–211.
- GASTEIGER, E., C. HOOGLAND, A. GATTIKER, S. DUVAUD, M. R. WILKINS, R. D. APPEL und A. BAIROCH (2005). „Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server“. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Hrsg. von J. M. WALKER. Totowa und NJ: Humana Press, S. 571–607.

- GIETZ, R. D. und A. SUGINO (1988). „New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites“. In: *Gene* 74.2, S. 527–534.
- GINIGER, E., S. M. VARNUM und M. PTASHNE (1985). „Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast“. In: *Cell* 40.4, S. 767–774.
- GONZÁLEZ SISO, M. I., M. A. FREIRE PICOS und M. E. CERDÁN (1996a). „Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by Kluyveromyces lactis rag2 mutants“. In: *FEBS letters* 387.1, S. 7–10.
- GONZÁLEZ SISO, M. I., E. RAMIL, M. E. CERDÁN und M. A. FREIRE-PICOS (1996b). „Respirofermentative metabolism in Kluyveromyces lactis: Ethanol production and the Crabtree effect“. In: *Enzyme and Microbial Technology* 18.8, S. 585–591.
- GONZÁLEZ SISO, M. I. und M. E. CERDÁN (2012). „Kluyveromyces lactis: a suitable yeast model to study cellular defense mechanisms against hypoxia-induced oxidative stress“. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, S. 634674.
- GONZÁLEZ-SISO, M., M. FREIRE-PICOS, E. RAMIL, M. GONZÁLEZ-DOMINGUEZ, A. RODRIGUEZ TORRES und M. CERDÁN (2000). „Respirofermentative metabolism in Kluyveromyces lactis“. In: *Enzyme and Microbial Technology* 26.9-10, S. 699–705.
- GRIGGS, D. W. und M. JOHNSTON (1991). „Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88.19, S. 8597–8601.
- HAGER, K. (2003). „Analyse der Spezifität der Gal1 - Gal80 Proteininteraktion“. Diss. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- HAGMAN, A., T. SÄLL und J. PIŠKUR (2014). „Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin“. In: *The FEBS journal* 281.21, S. 4805–4814.
- HANAHAHAN, D. (1983). „Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids“. In: *Journal of molecular biology* 166.4, S. 557–580.
- HANAHAHAN, D., J. JESSEE und F. R. BLOOM (1991). „Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria“. In: *Methods in enzymology* 204, S. 63–113.
- HEY, M. (2011). *Vergleichende Struktur- und Funktionsanalyse von Varianten des Transkriptionsinhibitors Gal80p*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- HITTINGER, C. T. und S. B. CARROLL (2007). „Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch“. In: *Nature* 449, S. 677–681.

- HOFFMAN, C. S. und F. WINSTON (1987). „A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*“. In: *Gene* 57.2-3, S. 267–272.
- HONG, M., M. X. FITZGERALD, S. HARPER, C. LUO, D. W. SPEICHER und R. MARMORSTEIN (2008). „Structural Basis for Dimerization in DNA Recognition by Gal4“. In: *Structure (London, England : 1993)* 16.7, S. 1019–1026.
- IGARASHI, M., T. SEGAWA, Y. NOGI, Y. SUZUKI und T. FUKASAWA (1987). „Autogenous regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene GAL80“. In: *Molecular & general genetics : MGG* 207.2-3, S. 273–279.
- JACOBY, J., C. P. HOLLENBERG und J. J. HEINISCH (1993). „Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway“. In: *Molecular Microbiology* 10.4, S. 867–876.
- JEWISON, T., C. KNOX, V. NEVEU, Y. DJOUMBOU, A. C. GUO, J. LEE, P. LIU, R. MANDAL, R. KRISHNAMURTHY, I. SINELNIKOV, M. WILSON und D. S. WISHART (2012). „YMDB: the Yeast Metabolome Database“. In: *Nucleic acids research* 40.Database issue, S. D815–20.
- JIANG, F., B. FREY, M. EVANS, J. FRIEL und J. HOPPER (2009). „Gene activation by dissociation of an inhibitor from a transcriptional activation domain“. In: *Molecular and cellular biology* 29.20, S. 5604–5610.
- JOHNSTON, M. (1987). „A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Microbiological reviews* 51.4, S. 458–476.
- KAR, R. K., H. KHARERIN, R. PADINHATEERI und J. BHAT (2015). *Multiple Conformations of Gal3 Protein Drive the Galactose Induced Allosteric Activation of the GAL Genetic Switch of Saccharomyces cerevisiae*.
- KEEGAN, L., G. GILL und M. PTASHNE (1986). „Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein“. In: *Science (New York, N.Y.)* 231.4739, S. 699–704.
- KINGSTON, R. L., R. K. SCOPES und E. N. BAKER (1996). „The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP“. In: *Structure (London, England : 1993)* 4.12, S. 1413–1428.
- KOSUGI, S., M. HASEBE, N. MATSUMURA, H. TAKASHIMA, E. MIYAMOTO-SATO, M. TOMITA und H. YANAGAWA (2009a). „Six classes of nuclear localization signals spe-

- cific to different binding grooves of importin alpha". In: *The Journal of biological chemistry* The Journal, S. 478–485.
- KOSUGI, S., M. HASEBE, M. TOMITA und H. YANAGAWA (2009b). „Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.25, S. 10171–10176.
- KUMAR, P., Y. YU, R. STERNGLANZ, S. JOHNSTON und L. JOSHUA-TOR (2008). „NADP regulates the yeast GAL induction system". In: *Science (New York, N.Y.)* 319.5866, S. 1090–1092.
- LA COUR, T., R. GUPTA, K. RAPACKI, K. SKRIVER, F. M. POULSEN und S. BRUNAK (2003). „NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals". In: *Nucleic acids research* 31.1, S. 393–396.
- LA COUR, T., L. KIEMER, A. MØLGAARD, R. GUPTA, K. SKRIVER und S. BRUNAK (2004). „Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals". In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 17.6, S. 527–536.
- LÄMMLI, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". In: *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- LAVY, T., P. KUMAR, H. HE und L. JOSHUA-TOR (2012). „The Gal3p transducer of the GAL regulon interacts with the Gal80p repressor in its ligand-induced closed conformation". In: *Genes & Development* Genes & de.3, S. 294–303.
- LAVY, T., H. YANAGIDA und D. S. TAWFIK (2016). „Gal3 Binds Gal80 Tighter than Gal1 Indicating Adaptive Protein Changes Following Duplication". In: *Molecular Biology and Evolution* 33.2, S. 472–477.
- LELOIR, L. F. (1951). „The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative". In: *Archives of biochemistry and biophysics* 33.2, S. 186–190.
- LEUTHER, K. K. und S. A. JOHNSTON (1992). „Nondissociation of GAL4 and GAL80 in vivo after galactose induction". In: *Science (New York, N.Y.)* 256.5061, S. 1333–1335.
- LI, Y., G. CHEN und W. LIU (2010a). „Multiple metabolic signals influence GAL gene activation by modulating the interaction of Gal80p with the transcriptional activator Gal4p". In: *Molecular microbiology* 78.2, S. 414–428.

- LI, Y., G. CHEN und W. LIU (2010b). „Multiple metabolic signals influence GAL gene activation by modulating the interaction of Gal80p with the transcriptional activator Gal4p“. In: *Molecular microbiology* 78.2, S. 414–428.
- LÖÖKE, M., K. KRISTJUHAN und A. KRISTJUHAN (2011). „Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications“. In: *BioTechniques* 50.5, S. 325–328.
- LUTTIK, M. A., K. M. OVERKAMP, P. KÖTTER, S. de VRIES, J. P. VAN DIJKEN und J. T. PRONK (1998). „The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH“. In: *The Journal of biological chemistry* 273.38, S. 24529–24534.
- MA, J. und M. PTASHNE (1987a). „A new class of yeast transcriptional activators“. In: *Cell* 51.1, S. 113–119.
- (1987b). „The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80“. In: *Cell* 50.1, S. 137–142.
- MA, J. und M. PTASHNE (1987c). „Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments“. In: *Cell* 48.5, S. 847–853.
- MACPHERSON, S., M. LAROCHELLE und B. TURCOTTE (2006). „A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins“. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70.3, S. 583–604.
- MASSA, M. L., J. J. GAGLIARDINO und F. FRANCINI (2011). „Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity“. In: *IUBMB life* 63.1, S. 1–6.
- MELCHER, K. und H. E. XU (2001). „Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression“. In: *The EMBO journal* 20.4, S. 841–851.
- MELCHER, K. (2005). „Mutational hypersensitivity of a gene regulatory protein: *Saccharomyces cerevisiae* Gal80p“. In: *Genetics* 171.2, S. 469–476.
- MENEZES, R. A., C. AMUEL, R. ENGELS, U. GENGENBACHER und J. LABAHN (2003). „Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP protein family“. In: *J. Mol. Biol* 333, S. 479–492.
- MESSENGUY, F. und E. DUBOIS (2000). „Regulation of Arginine Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: A Network of Specific and Pleiotropic Proteins in Response to Multiple Environmental Signals“. In: *Food technology and biotechnology*, 38 (4), S. 277–285.

- MEYER, J., A. WALKER-JONAH und C. P. HOLLENBERG (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*“. In: *Molecular and cellular biology* 11.11, S. 5454–5461.
- MILLER, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. [Cold Spring Harbor, N.Y.]: Cold Spring Harbor Laboratory.
- NEHLIN, J. O., M. CARLBERG und H. RONNE (1991). „Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response“. In: *The EMBO journal* 10.11, S. 3373–3377.
- NOGI, Y. und T. FUKASAWA (1989). „Functional domains of a negative regulatory protein, GAL80, of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Molecular and cellular biology* 9.7, S. 3009–3017.
- NOGI, Y., K. MATSUMOTO, A. TOH-E und Y. OSHIMA (1977). „Interaction of super-repressible and dominant constitutive mutations for the synthesis of galactose pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Molecular & general genetics* : MGG 152.3, S. 137–144.
- OKONECHNIKOV, K., O. GOLOSOVA und M. FURSOV (2012). „Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit“. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28.8, S. 1166–1167.
- PACE, C. N., F. VAJDOS, L. FEE, G. GRIMSLEY und T. GRAY (1995). „How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein“. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 4.11, S. 2411–2423.
- PANNALA, V. R., AHAMMED SHERIEF, K. Y., S. BHARTIYA und K. V. VENKATESH (2011). „Dynamic analysis of the KIGAL regulatory system in *Kluyveromyces lactis*: a comparative study with *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Systems and Synthetic Biology* 5.1-2, S. 69–85.
- PANNALA, V., S. BHARTIYA und K. VENKATESH (2010). „Experimental and steady-state analysis of the GAL regulatory system in *Kluyveromyces lactis*“. In: *The FEBS journal* 277.14, S. 2987–3002.
- PARTHUN, M. R. und J. A. JAEHNING (1992). „A transcriptionally active form of GAL4 is phosphorylated and associated with GAL80“. In: *Molecular and cellular biology* 12.11, S. 4981–4987.
- PENG, G. und J. E. HOPPER (2000). „Evidence for Gal3p’s cytoplasmic location and Gal80p’s dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for con-

- trolling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Molecular and cellular biology* 20.14, S. 5140–5148.
- PENG, G. und J. HOPPER (2002). „Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.13, S. 8548–8553.
- PILAURI, V., M. BEWLEY, C. DIEP und J. HOPPER (2005). „Gal80 dimerization and the yeast GAL gene switch“. In: *Genetics* 169.4, S. 1903–1914.
- PLATT, A. und R. REECE (1998). „The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex“. In: *The EMBO journal* 17.14, S. 4086–4091.
- PLATT, A., H. ROSS, S. HANKIN und R. REECE (2000). „The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.7, S. 3154–3159.
- POLLAK, N., C. DÖLLE und M. ZIEGLER (2007). „The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions“. In: *Biochemical Journal* 402.2, S. 205.
- QUAN, Y., Z.-L. JI, X. WANG, A. M. TARTAKOFF und T. TAO (2008). „Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins“. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7.7, S. 1254–1269.
- RALSER, M., M. M. WAMELINK, A. KOWALD, B. GERISCH, G. HEEREN, E. A. STRUYS, E. KLIPP, C. JAKOBS, M. BREITENBACH, H. LEHRACH und S. KROBITSCH (2007). „Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress“. In: *Journal of Biology* 6.4, S. 10.
- RAVCHEEV, D. A., X. LI, H. LATIF, K. ZENGLER, S. A. LEYN, Y. D. KOROSTELEV, A. E. KAZAKOV, P. S. NOVICHKOV, A. L. OSTERMAN und D. A. RODIONOV (2012). „Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex“. In: *Journal of bacteriology* 194.5, S. 1145–1157.
- RICE, P., I. LONGDEN und A. BLEASBY (2000). „EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite“. In: *Trends in genetics : TIG* 16.6, S. 276–277.
- RILEY, M. I., J. E. HOPPER, S. A. JOHNSTON und R. C. DICKSON (1987). „GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: glucose repression of the regulon“. In: *Molecular and cellular biology* 7.2, S. 780–786.

- ROSSMANN, M. G., D. MORAS und K. W. OLSEN (1974). „Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein“. In: *Nature* 250.5463, S. 194–199.
- RUBIO-TEXEIRA, M. (2005). „A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*“. In: *FEMS Yeast Research* 5.12, S. 1115–1128.
- SALMERON, J. M. und S. A. JOHNSTON (1986). „Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene LAC9 reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene“. In: *Nucleic acids research* 14.19, S. 7767–7781.
- SCHMIDT, D. (2010). *Biophysikalische und molekulargenetische Untersuchung der Dinukleotid-Bindung von Gal80 aus Saccharomyces cerevisiae und Kluyveromyces lactis*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- SELLICK, C., T. JOWITT und R. REECE (2009). „The effect of ligand binding on the galactokinase activity of yeast Gal1p and its ability to activate transcription“. In: *The Journal of biological chemistry* 284.1, S. 229–236.
- SHERMAN, F. (1991). „Getting started with yeast“. In: *Methods in enzymology* 194, S. 3–21.
- SNOEK, I. S. und H. Y. STEENSMA (2006). „Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome“. In: *FEMS Yeast Research* 6.3, S. 393–403.
- SOUTOGLOU, E., M. A. DEMÉNY, E. SCHEER, G. FIENGA, P. SASSONE-CORSI und L. TORA (2005). „The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners“. In: *Molecular and cellular biology* 25.10, S. 4092–4104.
- SPORTY, J. L., M. M. KABIR, K. W. TURTELTAUB, T. OGNIBENE, S.-J. LIN und G. BENCH (2008). „Single sample extraction protocol for the quantification of NAD and NADH redox states in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Journal of separation science* 31.18, S. 3202–3211.
- STRAUBE, K., J. S. BLACKWELL und L. F. PEMBERTON (2010). „Nap1 and Chz1 have separate Htz1 nuclear import and assembly functions“. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11.2, S. 185–197.
- SUZUKI-FUJIMOTO, T., M. FUKUMA, K. I. YANO, H. SAKURAI, A. VONIKA, S. A. JOHNSTON und T. FUKASAWA (1996). „Analysis of the galactose signal transduction pa-

- thway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p". In: *Molecular and cellular biology* 16.5, S. 2504–2508.
- TARRÍO, N., M. E. CERDÁN und M. I. GONZÁLEZ SISO (2006). „Characterization of the second external alternative dehydrogenase from mitochondria of the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*". In: *Biochimica et biophysica acta* 1757.11, S. 1476–1484.
- TEWS, A. (2009). *Untersuchungen zur Lokalisation von KlGal80p in Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- THEOBALD, U., W. MAILINGER, M. BALTES, M. RIZZI und M. REUSS (1997). „In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations". In: *Biotechnology and bioengineering* 55.2, S. 305–316.
- THODEN, J. B., C. A. SELLICK, D. J. TIMSON, R. J. REECE und H. M. HOLDEN (2005). „Molecular structure of *Saccharomyces cerevisiae* Gal1p, a bifunctional galactokinase and transcriptional inducer". In: *The Journal of biological chemistry* 280.44, S. 36905–36911.
- THODEN, J., L. RYAN, R. REECE und H. HOLDEN (2008). „The interaction between an acidic transcriptional activator and its inhibitor. The molecular basis of Gal4p recognition by Gal80p". In: *The Journal of biological chemistry* 283.44, S. 30266–30272.
- THODEN, J., C. SELLICK, R. REECE und H. HOLDEN (2007). „Understanding a transcriptional paradigm at the molecular level. The structure of yeast Gal80p". In: *The Journal of biological chemistry* 282.3, S. 1534–1538.
- TIMSON, D. J., H. C. ROSS und R. J. REECE (2002). „Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry". In: *The Biochemical journal* 363.Pt 3, S. 515–520.
- TRAVEN, A., B. JELICIC und M. SOPTA (2006). „Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited". In: *EMBO reports* 7.5, S. 496–499.
- UPADHYAY, S. K. (2014). „Dynamics of Gal80p in the Gal80p-Gal3p complex differ significantly from the dynamics in the Gal80p-Gal1p complex: implications for the higher specificity of Gal3p". In: *Molecular BioSystems* 10.12, S. 3120–3129.
- UPADHYAY, S. und Y. SASIDHAR (2012). „Molecular simulation and docking studies of Gal1p and Gal3p proteins in the presence and absence of ligands ATP and galactose: implication for transcriptional activation of GAL genes". In: *Journal of computer-aided molecular design* 26.7, S. 847–864.

- VISSER, W., W. A. SCHEFFERS, d. V. W. BATENBURG-VAN und J. P. VAN DIJKEN (1990). „Oxygen requirements of yeasts“. In: *Applied and environmental microbiology* 56.12, S. 3785–3792.
- VOLLENBROICH, V., J. MEYER, R. ENGELS, G. CARDINALI, R. A. MENEZES und C. P. HOLLENBERG (1999). „Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p“. In: *Molecular & general genetics : MGG* 261.3, S. 495–507.
- WICKERHAM, L. J. (1951). „Taxonomy of Yeasts“. In: *Technical United States Department of Agriculture: Washington Bulletin* No. 1029.
- WIERENGA, R. K., P. TERPSTRA und W. G. HOL (1986). „Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint“. In: *Journal of molecular biology* 187.1, S. 101–107.
- WIERTMAN, M. B. und J. S. SMITH (2014). „Yeast sirtuins and the regulation of aging“. In: *FEMS Yeast Research* 14.1, S. 73–88.
- WIGHTMAN, R., R. BELL und R. REECE (2008). „Localization and interaction of the proteins constituting the GAL genetic switch in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Eukaryotic cell* 7.12, S. 2061–2068.
- WRAY, L. V., M. M. WITTE, R. C. DICKSON und M. I. RILEY (1987). „Characterization of a positive regulatory gene, LAC9, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Molecular and cellular biology* 7.3, S. 1111–1121.
- YANO, K. und T. FUKASAWA (1997). „Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.5, S. 1721–1726.
- ZACHARIAE, W. und K. BREUNIG (1993). „Expression of the transcriptional activator LAC9 (KIGAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation“. In: *Molecular and cellular biology* 13.5, S. 3058–3066.
- ZACHARIAE, W. (1994). *Regulation des Hefetranskriptionsaktivators Lac9*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- ZENKE, F. T., W. ZACHARIAE, A. LUNKES und K. D. BREUNIG (1993). „Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon“. In: *Molecular and cellular biology* 13.12, S. 7566–7576.

- ZENKE, F., R. ENGLER, V. VOLLENBROICH, J. MEYER, C. HOLLENBERG und K. BREUNIG (1996). „Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p“. In: *Science (New York, N.Y.)* 272.5268, S. 1662–1665.
- ZENKE, F., L. KAPP und K. BREUNIG (1999). „Regulated Phosphorylation of the Gal4p Inhibitor Gal80p of *Kluyveromyces lactis* Revealed by Mutational Analysis“. In: *Biological chemistry* 380.4.
- ZHANG, J., A. ten PIERICK, H. M. VAN ROSSUM, R. M. SEIFAR, C. RAS, J.-M. DARAN, J. J. HEIJNEN und S. A. WAHL (2015). „Determination of the Cytosolic NADPH/NADP Ratio in *Saccharomyces cerevisiae* using Shikimate Dehydrogenase as Sensor Reaction“. In: *Scientific reports* 5, S. 12846.
- ZHENG, X., X. DAI, Y. ZHAO, Q. CHEN, F. LU, D. YAO, Q. YU, X. LIU, C. ZHANG, X. GU und M. LUO (2007). „Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.21, S. 8809–8814.
- ZUGOWSKI, C. (2013). *Molecular genetic and biochemical interaction studies of the transcriptional activator Gal4 and its repressor Gal80 in Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces lactis*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

# DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karin Breunig für die Vergabe dieses spannenden Themas, die Betreuung dieser Arbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Molekulargenetik für die schöne Zusammenarbeit, die hohe Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Zudem möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, für die moralische und auch finanzielle Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Janet für ein stetig offenes Ohr, motivierende Worte sowie Rückhalt und Verständnis besonders während der letzten Phase dieser Arbeit.

# EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Außerdem erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle/Saale, den 27.06.2016

---

Annekathrin Reinhardt-Tews

---

# LEBENS LAUF

---

## PERSÖNLICHE DATEN

VOR- UND ZUNAME: Annekathrin Reinhardt-Tews  
AKADEMISCHER GRAD: Diplom-Biologin  
GEBURTSdatum: 09.01.1985  
GEBURTSORT: Halle/Saale  
WOHNORT: Torstraße 46a, 06110, Halle/Saale  
GESCHLECHT: weiblich  
STAATSANGEHÖRIGKEIT: deutsch

## AUSBILDUNG UND BERUFLICHE QUALIFIKATION

06/2004	<b>Abitur</b> Christian-Wolff-Gymnasium Halle/Saale Note 1,0
10/2004 - 12/2009	<b>Studium der Biologie</b> an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Lokalisation von <i>KlGal80p</i> in <i>Kluyveromyces lactis</i> “ Abschluss als Diplom-Biologin (Note 1,1)
02/2010 - 06/2014	<b>Promotionsstudentin</b> an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und <b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> in der AG Molekulargenetik in folgenden Projekten <b>DFG-Projekt</b> „Regulation der Transkriptionsaktivierungsfunktion von Gal4 durch Gal80“ <b>DFG-Schwerpunktprogramm SPP 1395</b> Informations- und Kommunikationstheorie in der Molekularbiologie (InKoMBio) Förderung durch ein <b>Promotionsstipendium im Graduiertenkolleg 1026</b> „Conformational transitions in macromolecular interactions“
06/2014 –08/2015	Elternzeit
SEIT 08/2015	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> AG Molekulargenetik Martin-Luther-Universität im DFG-Projekt „Regulation des Elongator- und des DPH-Komplexes durch das Kti11/Kti13 Heterodimer “

---

PUBLIKATIONEN

Blüher, D., A. Reinhardt-Tews, M. Hey, H. Lilie, R. Golbik, K. D. Breunig *et al.* (2014). „An ancient oxidoreductase making differential use of its cofactors“. In: *Biological chemistry* 395.7-8, S. 855–869

Halle/Saale, den 27.06.2016