

**„Konsequenzen der Genom-Duplikation in Hefe:  
Vergleichende Untersuchungen zur kohlenstoffregulierten  
Transkription in pre- und post-*whole genome duplication* (WGD)  
Spezies“**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Katharina Strödecke

geb. am 12. Februar 1988 in Leipzig

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Karin Breunig
2. Herr Prof. Dr. Carsten Milkowski
3. Frau Prof. Dr. Rosaura Rodicio, Universität Oviedo, Spanien

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.05.2017

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Evolution der <i>Saccharomyces</i> -Klade.....	1
1.2. Konsequenzen der Genomduplikation für den Metabolismus der Hefen.....	3
1.3. Kohlenstoffmetabolismus in Hefen.....	6
1.3.1. Verwertung von Glukose in <i>S. cerevisiae</i> .....	7
1.3.2. Verwertung von Glukose in <i>K. lactis</i> .....	8
1.3.3. Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe.....	12
1.4. Regulation des Kohlenstoffmetabolismus über den Snf1-Signalweg.....	13
1.5. Regulation des Kohlenstoffmetabolismus durch Adr1.....	19
1.6. <i>FBP1</i> - ein Schlüsselgen der Gluconeogenese.....	21
1.7. Zielstellung dieser Arbeit.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Material.....	24
2.1.1. Hefe-Stämme und Anzuchtbedingungen.....	24
2.1.1.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> -Stämme und Genbezeichnung in <i>K. lactis</i> .....	24
2.1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	25
2.1.1.3. <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	26
2.1.2. Konstruktion von Hefestämmen durch <i>gene replacement</i> .....	26
2.1.3. Plasmide.....	27
2.1.4. Oligonukleotide.....	28
2.1.5. Antikörper.....	28
2.1.6. Zentrifugen.....	28
2.1.7. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme).....	28
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Transformation von Mikroorganismen.....	28
2.2.1.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	28
2.2.1.2. Transformation von Hefen.....	29
2.2.2. Präparation von DNA und DNA-basierte Methoden.....	30
2.2.2.1. Isolation plastidärer DNA aus <i>E. coli</i> .....	30
2.2.2.2. Isolation plastidärer DNA aus Hefe.....	30
2.2.2.3. Isolation chromosomaler DNA aus Hefe.....	30

2.2.2.4.	Schnellisolation von Gesamt-DNA aus Hefe für Kolonie-PCR .....	31
2.2.2.5.	Modifizierung und Analyse von DNA.....	31
2.2.2.5.1.	Amplifizierung von DNA-Sequenzen .....	31
2.2.2.5.2.	Agarosegel-Elektrophorese .....	32
2.2.2.5.3.	DNA-Elution aus Agarosegelen .....	32
2.2.2.5.4.	Restriktion von DNA .....	32
2.2.2.5.5.	Dephosphorylierung von DNA.....	32
2.2.2.5.6.	Ligation .....	32
2.2.2.5.7.	<i>Blunting</i> von DNA-Überhängen.....	33
2.2.2.5.8.	Digoxygenin-Markierung von DNA.....	33
2.2.2.5.9.	Herstellung einer DIG-markierten DNA-Leiter .....	33
2.2.2.5.10.	Reinigung von PCR-Produkten .....	33
2.2.2.5.11.	Fällung von DNA .....	33
2.2.2.5.12.	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33
2.2.2.5.13.	Ortsgerichtete Mutagenese .....	34
2.2.2.5.14.	InFusion-Klonierung .....	34
2.2.2.5.15.	Sequenzierung.....	34
2.2.2.5.16.	<i>Southern Blot</i> -Analyse .....	34
2.2.3.	Präparation von RNA und RNA-basierte Methoden .....	35
2.2.3.1.	RNA-Isolation aus <i>E. coli</i> .....	35
2.2.3.2.	RNA-Isolation aus Hefe .....	36
2.2.3.3.	Analyse von Transkriptlevel mittels quantitativer RT-PCR.....	36
2.2.3.4.	<i>Northern Blot</i> -Analyse .....	37
2.2.3.5.	Genomweite Untersuchung der Genexpression ( <i>Microarray</i> -Analyse).....	37
2.2.4.	Präparation von Proteinen und Protein-basierte Methoden.....	39
2.2.4.1.	Isolation von Gesamt-Rohextrakt aus Hefe.....	39
2.2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
2.2.4.3.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.2.4.4.	Immunologischer Nachweis von Proteinen ( <i>Western Blot</i> -Analyse) .....	40
2.2.4.5.	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	40
2.2.4.6.	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	40
2.2.4.6.1.	$\beta$ -Glucuronidase-Aktivität .....	40
2.2.4.6.2.	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	41
2.2.4.6.3.	Isocitratlyase-Aktivität.....	41
2.2.4.6.4.	Nachweis der Adh-Aktivität über <i>in gel</i> -Färbung.....	42
2.2.4.7.	Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP).....	42

2.2.4.8.	<i>Pulldown</i> DNA-bindender Proteinen .....	44
2.2.4.9.	Expression und Aufreinigung von rekombinanten GST- <i>KIReb1</i> .....	46
2.2.4.10.	Nicht-radioaktiver EMSA ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ).....	47
2.2.5.	Phänotypische Charakterisierung von Hefen .....	47
3.	Ergebnisse.....	48
3.1.	Analysen zur Verwertung alternativer Kohlenstoffe in <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	48
3.1.1.	Einfluss von Ethanol auf metabolische Prozesse.....	49
3.1.2.	Einfluss von Glycerol auf metabolische Prozesse.....	55
3.2.	Analysen zum Transkriptionsfaktor <i>KIAdr1</i> .....	59
3.2.1.	<i>KLLA0F013046g</i> kodiert für ein Homolog von <i>ScAdr1</i> .....	59
3.2.2.	Rolle von <i>KIAdr1</i> bei Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen.....	61
3.2.3.	<i>KIAdr1</i> vermittelt Glycerol-Repression am <i>KIICL1</i> -Promotor .....	64
3.2.4.	<i>KIAdr1</i> und <i>KISip4</i> co-regulieren die <i>KIICL1</i> -Aktivität .....	65
3.2.5.	Charakterisierung der Bindung von <i>KIAdr1</i> am <i>KIICL1</i> -Promotor .....	71
3.2.5.1.	<i>KIAdr1</i> bindet am <i>KIICL1</i> -Promotor .....	71
3.2.5.2.	<i>KIAdr1</i> -Bindung an $P_{KIICL1}$ ist nicht relevant für Glycerol-Repression .....	74
3.2.5.3.	Die Überexpression der <i>KIAdr1</i> -Bindedomäne ähnelt einer <i>KIADR1</i> -Deletion.....	75
3.2.5.4.	Mutationen in der <i>KIAdr1</i> -Bindedomäne beeinflussen Bindung am <i>ScADH2</i> -, aber nicht am <i>KIICL1</i> -Promotor.....	76
3.2.6.	Analysen zum Mechanismus der Co-Regulation von <i>KIAdr1</i> und <i>KISip4</i> .....	79
3.2.6.1.	<i>KISip4</i> -Transkript- und Proteinlevel sind unabhängig von <i>KIAdr1</i> .....	80
3.2.6.2.	Bindung von <i>KISip4</i> am <i>KIICL1</i> -Promotor wird von <i>KIAdr1</i> nicht beeinflusst .....	81
3.2.6.3.	Beeinflusst <i>KIAdr1</i> das <i>KISip4</i> -Aktivierungspotential? .....	82
3.2.7.	Analysen zum Einfluss von <i>KIAdr1</i> bei Wachstum auf Glycerol und Ethanol.....	85
3.2.8.	Gegenüberstellung von <i>Microarray</i> - und qRT-PCR-Expressionsdaten.....	89
3.3.	Analysen zur transkriptionellen Regulation von <i>KIFBP1</i> .....	91
3.3.1.	<i>KIFBP1</i> -Expression wird durch nicht-fermentierbare C-Quellen induziert .....	91
3.3.2.	Transkriptionelle <i>ScFBP1</i> -Regulation ist nicht übertragbar auf <i>KIFBP1</i> .....	92
3.3.3.	Identifizierung <i>cis</i> -regulatorischer Bereiche des <i>KIFBP1</i> -Promotors .....	94
3.3.4.	Der <i>KIFBP1</i> -Promotor ist in <i>S. cerevisiae</i> transkriptionell inaktiv.....	96
3.3.5.	Etablierung eines genetisches Ansatzes, um $UAS_{KIFBP1}$ -Transaktivatoren zu finden. 97	
3.3.6.	Isolierung $UAS_{KIFBP1}$ -bindender Proteine mittels <i>Pulldown</i> -Assay .....	102
3.3.7.	GST- <i>KIReb1</i> bindet am $UAS_{KIFBP1}$ .....	104
3.3.8.	Deletion der <i>KIReb1</i> -Bindestelle beeinflusst Promotoraktivität nicht <i>in vivo</i> .....	106
4.	Diskussion .....	108
4.1.	Verwertung von Ethanol und Glycerol als Kohlenstoffquelle in <i>K. lactis</i> .....	108

4.2.	Unterschiede zur Verwertung von Ethanol in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	111
4.3.	Unterschiede zur Verwertung von Glycerol in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	114
4.4.	Untersuchungen zum Transkriptionsfaktor <i>KIAdr1</i> .....	118
4.4.1.	Die Bedeutung von <i>KIAdr1</i> für den Kohlenstoffmetabolismus auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen .....	119
4.4.2.	<i>KIAdr1</i> und <i>KISip4</i> co-regulieren Gene des Kohlenstoffmetabolismus .....	123
4.4.3.	Negative Regulation von <i>KISip4</i> durch <i>KIAdr1</i> am <i>KIICL1</i> -Promotor .....	124
4.5.	Transkriptionelle Regulation von <i>KIFBP1</i> .....	128
4.5.1.	Induktion der <i>KIFBP1</i> -Expression durch $UAS_{KIFBP1}$ .....	129
4.5.2.	Einfluss von <i>KIReb1</i> am <i>KIFBP1</i> -Promotor .....	131
4.5.3.	Einfluss isolierter Suppressoren auf $UAS_{KIFBP1}$ -Aktivität .....	134
5.	Zusammenfassung .....	137
6.	Literaturverzeichnis .....	139
7.	Anhang .....	159

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Saccharomycotina.....	2
Abbildung 2: Ursprung einer Hybridisierung in der <i>Saccharomyces</i> -Klade. ....	3
Abbildung 3: Stoffwechselwege zur Verwertung von Glukose und alternativen C-Quellen. ....	9
Abbildung 4: <i>RAG1</i> -Lokus der <i>Kluyveromyces lactis</i> -Stämme JA6 und CBS2359.....	10
Abbildung 5: Snf1-Signalweg in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	14
Abbildung 6: Struktur und Regulation von <i>Adr1</i> in <i>S. cerevisiae</i> . ....	20
Abbildung 7: Transkriptionelle Regulation der <i>ScFBP1</i> -Expression. ....	22
Abbildung 8: Konstruktion eines <i>Scsip4</i> -Deletionsstammes in <i>S. cerevisiae</i> . ....	27
Abbildung 9: Ethanol verursacht umfangreichere Transkriptomveränderungen als Glycerol.	49
Abbildung 10: Einfluss von Ethanol und Glycerol auf Genexpression von Kohlenstoff- metabolismus und Proteinbiosynthese.....	50
Abbildung 11: Anreicherung vieler DEGs in Kohlenstoffmetabolismus und Proteinsynthese.	52
Abbildung 12: Ethanol induziert Glyoxylat-Zyklus und Fettsäure-Oxidation.....	53
Abbildung 13: Glycerol als C-Quelle führt zur starker Induktion des Methylcitrat-Zyklus. ....	56
Abbildung 14: <i>Adr1</i> DNA-Bindedomäne und PAR-Region sind in verschiedenen Hefespezies hoch konserviert. ....	60
Abbildung 15: <i>KIAdr1</i> kann <i>ScAdr1</i> funktionell ersetzen. ....	60
Abbildung 16: Konstruktion des <i>Kladr1::ScURA3</i> -Stammes.....	61
Abbildung 17: Die Deletion von <i>KIADR1</i> bewirkt keinen Wachstumsdefekt auf nicht- fermentierbaren Kohlenstoffen.....	62
Abbildung 18: Einfluss von <i>KIADR1</i> auf Glycerol-vermittelte Repression von <i>KIICL1</i> . ....	65
Abbildung 19: <i>adr1Δsip4Δ</i> -Mutante bewirkt keinen zusätzlichen Wachstumsdefekt.....	67
Abbildung 20: <i>Ksip4Δ</i> verhält sich epistatisch über <i>Kladr1Δ</i> . ....	68
Abbildung 21: Konstruktion eines (HA) <sub>3</sub> - <i>KIAdr1</i> Stammes .....	71
Abbildung 22: Expressionsanalyse von <i>KIADR1</i> in Glycerol und Ethanol.....	72
Abbildung 23: <i>KIAdr1</i> bindet an die Promotoren von <i>KIICL1</i> , <i>KIMLS1</i> und <i>KICIT2</i> . ....	73
Abbildung 24: <i>KIAdr1</i> -Bindestellen im <i>P<sub>KIICL1</sub></i> ist nicht nötig für Glycerol-Repression.....	74
Abbildung 25: Überexpression der <i>KIAdr1</i> -Bindedomäne ähnelt einer <i>KIADR1</i> -Deletion. ....	76
Abbildung 26: Mutationen in der PAR-Region beeinflussen die Bindefähigkeit von <i>KIAdr1</i> ...	77
Abbildung 27: Kein Einfluss durch PAR-Mutationen von <i>KIAdr1</i> in <i>K. lactis</i> .....	79
Abbildung 28: Einfluss einer <i>KIADR1</i> -Deletion auf die <i>KISIP4</i> -Expression. ....	80

Abbildung 29: <i>KISip4</i> bindet unabhängig von <i>KIAdr1</i> an <i>KIICL1</i> -Promotor.....	81
Abbildung 30: Stamm- und Plasmid-Konstruktion zu Untersuchung der <i>KISip4</i> -AD. ....	82
Abbildung 31: <i>LAC4</i> -Expression durch GBD-Sip4 ist abhängig von Kohlenstoffquelle. ....	83
Abbildung 32: GBD-Sip4-Proteinlevel ist abhängig von der Kohlenstoffquelle. ....	85
Abbildung 33: Pearson-Korrelation zwischen biologischen Replikaten von WT und <i>Kladr1Δ</i> .	86
Abbildung 34: <i>Kladr1Δ</i> zeigt kaum Veränderungen im Transkriptom bei Wachstum auf Ethanol oder Glycerol. ....	87
Abbildung 35: Vergleich der Expressionsdaten aus <i>Microarray</i> und qRT-PCR in <i>Kladr1Δ</i> . ....	90
Abbildung 36: Die Induktion von <i>KIFBP1</i> ist abhängig von <i>KISnf1</i> und der C-Quelle.....	92
Abbildung 37: Transkriptionelle Regulation des <i>KIFBP1</i> -Promotors erfolgt unabhängig von aus <i>S. cerevisiae</i> bekannten Transkriptionsfaktoren.....	93
Abbildung 38: Identifizierung von $UAS_{KIFBP1}$ .....	94
Abbildung 39: Aktivierung von $UAS_{KIFBP1}$ ist abhängig von <i>KISnf1</i> . ....	95
Abbildung 40: Genetischer Ansatz zur Identifizierung $UAS_{KIFBP1}$ -aktivierender Faktoren. ....	98
Abbildung 41: Acht isolierte Plasmide supprimieren den His <sup>-</sup> -Wachstumsdefekt von AKY2..	99
Abbildung 42: Potentielle Aktivatoren haben keinen Einfluss auf <i>KIFBP1</i> -Expression.....	101
Abbildung 43: <i>Pulldown</i> zur Isolierung $UAS_{KIFBP1}$ -bindender Proteine.....	102
Abbildung 44: Elution $UAS_{KIFBP1}$ -bindender Proteine von Magnet <i>beads</i> . ....	103
Abbildung 45: GST- <i>KIReb1</i> bindet nur DNA mit <i>Reb1</i> -Konsensusmotiv. ....	105
Abbildung 46: Die Bindung von GST- <i>KIReb1</i> an <i>KIFBP1</i> -Promotor ist spezifisch. ....	106
Abbildung 47: <i>KIReb1</i> -Bindestelle hat keinen Einfluss auf <i>KIFBP1</i> -Promotoraktivität. ....	107
Abbildung 48: Einfluss von Ethanol in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	112
Abbildung 49: Einfluss von Glycerol in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	115
Abbildung 50: Mögliche Mechanismen der <i>KIAdr1</i> -vermittelten Repression an <i>KIICL1</i> . ....	126
Abbildung 51: CSREs in <i>FBP1</i> -Promotoren verschiedener Saccharomycotina-Spezies. ....	128
Abbildung 52: Chromatinstruktur am <i>FBP1</i> -Promotor in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> . ....	133
Abbildung A1: Klonierung <i>KIADR1</i> -Deletionsplasmid. ....	170
Abbildung A2: Klonierung verschiedener $P_{KIFBP1}$ -Konstrukte. ....	171
Abbildung A3: Sequenzvergleich von <i>Adr1</i> in verschiedenen Ascomycota-Spezies.....	174
Abbildung A4: Sequenzvergleich von <i>Mpa43</i> in verschiedenen Saccharomycotina. ....	175

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>K. lactis</i> -Stämme .....	24
Tabelle 2: Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	25
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme .....	26
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	27
Tabelle 5: Verwendete Antikörper .....	28
Tabelle 6: Reaktionsansatz und PCR-Programm für <i>Phusion</i> , <i>Taq</i> und <i>OptiTaq</i> Polymerase..	31
Tabelle 7: Expressionslevel von Schlüsselenzymen zur Verwertung alternativer C-Quellen. .	63
Tabelle 8: Einfluss von <i>Kladr1Δsip4Δ</i> auf die Expression <i>KISip4</i> -abhängiger Gene .....	69
Tabelle 9: Der <i>KIFBP1</i> -Promotor ist in <i>S. cerevisiae</i> nicht induzierbar .....	97
Tabelle 10: Aus Genbank „ <i>Curie Pool</i> “ isolierte Suppressor-Plasmide. ....	100
Tabelle 11: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. ....	104
Tabelle 12: Kohlenstoffquellen-abhängige Induktion von Genen des Threonin-Abbaus und des Methylcitrat-Zyklus in Spezies der <i>Saccharomyces</i> -Klade.....	116
Tabelle 13: <i>Adr1</i> -abhängige Gene in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> (Auszug).....	120
Tabelle 14: Putative Bindestellen im UAS <sub><i>KIFBP1</i></sub> .....	130
Tabelle A1: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide .....	159
Tabelle A2: Oligonukleotide für Stammkonstruktion .....	162
Tabelle A3: Oligonukleotide für Konstruktionen zur <i>KIFBP1</i> -Promotoranalyse .....	163
Tabelle A4: Oligonukleotide für weitere Fusionskonstrukte .....	163
Tabelle A5: Oligonukleotide für quantitative PCR .....	164
Tabelle A6: Oligonukleotide für Nachweis und Sequenzierung bei Plasmidkonstruktion sowie für <i>Northern Blot</i> -Analysen .....	165
Tabelle A7: Oligonukleotide für <i>Pulldown</i> und EMSA-Analyse .....	166
Tabelle A8: Verwendete Chemikalien und Enzyme .....	166
Tabelle A9: Relative Genexpression im Wildtyp (Glycerol bzw. Ethanol vs. Glukose) .....	168
Tabelle A10: Relative Genexpression in <i>Kladr1Δ</i> vs. Wildtyp (Glycerol und Ethanol).....	168
Tabelle A11: Genombereich isolierter Suppressorplasmide.....	169
Tabelle A12: <i>Adr1</i> -abhängige Gene in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	169
Tabelle A13: Zuordnung der <i>Microarray</i> -Daten.....	169



## Abkürzungsverzeichnis

'	Minute	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
"	Sekunde	His <sup>-</sup>	Histidin fehlt
μ-	mikro-	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol	J	Joule
Ade <sup>+</sup>	Adenin enthalten	<i>Kan<sup>R</sup></i>	Kanamycin-Resistenz
ADH	Alkoholdehydrogenase	kb	Kilobasenpaare
ADP	Adenosindiphosphat	kDa	Kilodalton
AID	Autoinhibitorische Domäne	<i>Kl</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
AK	Antikörper	l	Liter
AMP	Adenosinmonophosphat	M	Molar
AS/B	Aminosäuren / Basen	m	Meter
ATP	Adenosintriphosphat	m-	milli-
bp	Basenpaar	Met <sup>-</sup>	Methionin fehlt
ca.	circa	min	Minute
cDNA	<i>complementary DNA</i>	Mio.	Millionen
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
cm	Zentimeter	mRNA	<i>messenger RNA</i>
CSRE	<i>carbon source-responsive element</i>	n-	nano-
DBD	DNA-Bindedomäne	NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
DEPC	Diethylcarbonat	NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
DIG	Digoxygenin	NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	OD	Optische Dichte
DTT	1,4-Dithiothreitol	ONPG	O-Nitrophenyl-D-galactopyranosid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ORF	<i>open reading frame</i>
<i>et al.</i>	und alle	p-	piko-
EtOH	Ethanol	P	Promotor
f-	femto-	PAA	Polyacrylamid
FC	<i>Fold Change</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
FOA	<i>5-Fluoroorotic Acid</i>	PAR	<i>proximal accessory region</i>
g	Gramm	PAS	Protein A-Sepharose
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
GBD	ScGal4-Bindedomäne	PCR	Polymerasekettenreaktion
Glyc	Glycerol	PDH	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
GST	Glutathione-S-Transferase		
GUS	β-Glucuronidase		
h	Stunde		
HA	Hämagglutinin		

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>PEG</b>	Polyethylenglycol	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>PFK-2</b>	6-Phosphofructo-2-Kinase	<b>TBST</b>	<i>Tris-Buffered Saline</i> + Tween 20
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid	<b>TCA</b>	Tricarbonsäure
<b>PNP</b>	p-Nitrophenol	<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>PNPG</b>	4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside	<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>PPP</b>	Pentosephosphatweg	<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>q</b>	quantitativ	<b>U</b>	Unit (Einheit Enzymaktivität)
<b>R</b>	relative Expression	<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>RD</b>	regulatorische Domäne	<b>UAS</b>	<i>upstream activating sequence</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure	<b>Ura<sup>-</sup></b>	Uracil fehlt
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase	<b>V</b>	Volt
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>v/v</b>	<i>volume per volume</i>
<b>SD</b>	Standardabweichung	<b>Vol.</b>	Volumen
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat	<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i>
<b>SSC</b>	Natriumchlorid–Natriumcitrat-Puffer	<b>WGD</b>	<i>whole genome duplication</i>
<b>T<sub>A</sub></b>	<i>Annealing</i> -Temperatur	<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<b>TAD</b>	Transkriptionsaktivierungsdomäne	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>		

## 1. Einleitung

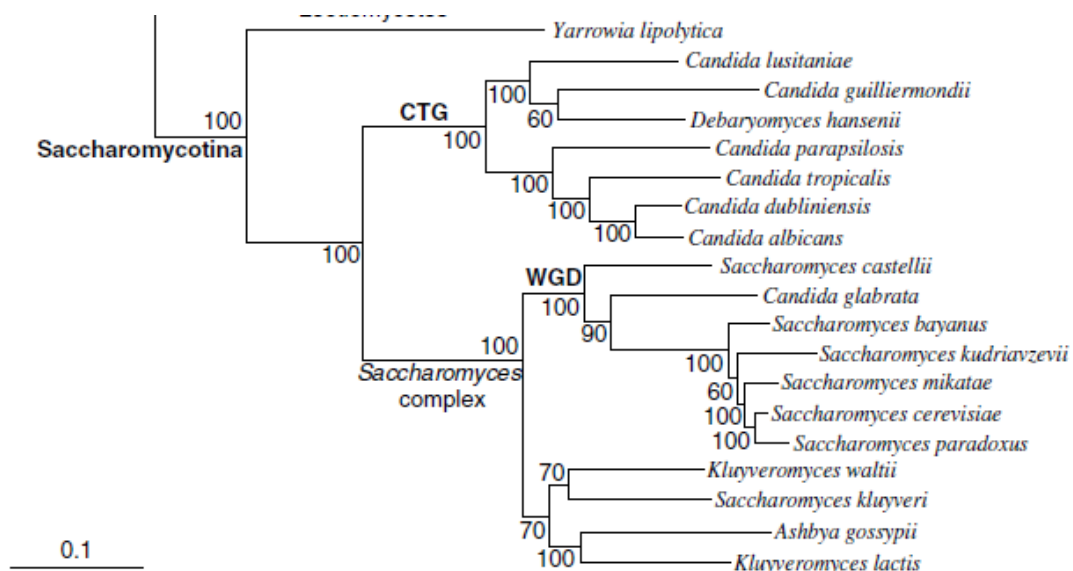
*„It is not the strongest of the species that survives,  
nor the most intelligent that survives.  
It is the one that is most adaptable to change.“*

Charles Darwin

Das Leben ist ein ständiger Kampf ums Überleben. Bereits Darwin sprach in seinem Werk *„On the Origin of Species“* vom Überleben durch Veränderung. Nur diejenigen Individuen, die am besten an ihren Lebensraum angepasst sind, können sich im Wettstreit um lebenswichtige Ressourcen gegenüber anderen Individuen durchsetzen. Diese Tatsache bildet eine wichtige Triebfeder der Evolution, die zur Entwicklung von einfachen Einzellern zu hoch komplexen Organismen führte. Zahlreiche grundlegende zelluläre Prozesse, die sich während der Evolution als bewährt herauskristallisiert haben, wurden beibehalten und sind daher gleichermaßen in vielen Eukaryoten präsent. Gewonnene Erkenntnisse aus einzelligen Modellorganismen lassen sich daher oftmals auf höhere Eukaryoten übertragen. Ein beliebter Modellorganismus dafür ist *Saccharomyces cerevisiae*, der 1935 durch Untersuchungen von Ojvind Winge Einzug in die Forschung hielt.

### 1.1. Evolution der *Saccharomyces*-Klade

*S. cerevisiae* gehört systematisch gesehen zu den echten Hefen (Saccharomycotina), einer monophyletischen Ordnung der Ascomycota. Schlauchpilze bilden eine große Abteilung der Pilze und sind namensgebend durch einen die Sporen umgebenden Ascus charakterisiert (James *et al.*, 2006). Die Ascomycota haben sich vermutlich vor etwa 741 bis 1195 Mio. Jahren von ihrer Schwesterngruppe, den Basidiomycota, abgespalten. „Kurz“ darauf, vor 798 bis 1166 Mio. Jahren, folgte die Aufspaltung der Schlauchpilze in drei Unterabteilungen: Archaeo-, Eu- und Hemiascomycota (auch Saccharomycotina genannt) (Hedges *et al.*, 2004). Die Gruppe der Archaeoascomycota, zu der die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* gehört, hat sich vermutlich schon sehr früh von den anderen Schlauchpilzen getrennt (Heckman *et al.*, 2001).

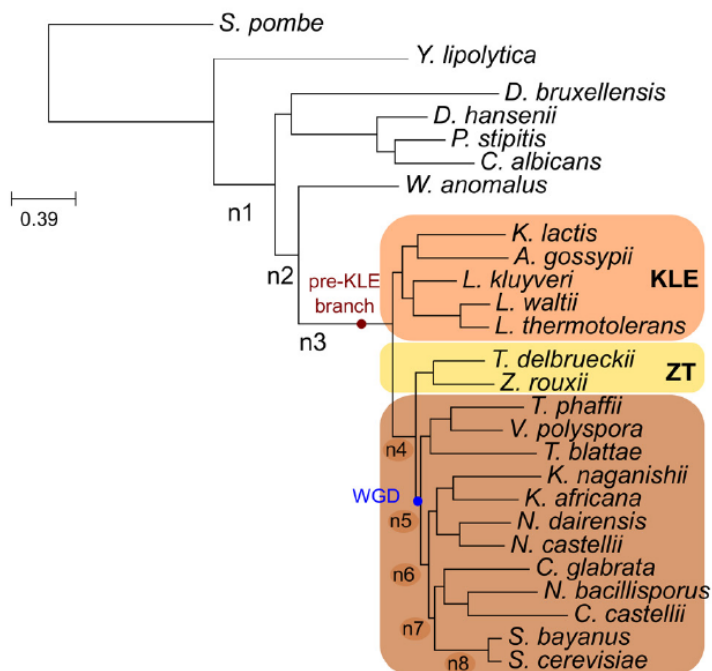


**Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Saccharomycotina.**

Auszug aus dem phylogenetischen Stammbaum von Fitzpatrick *et al.* (2006), bearbeitet durch Scannell *et al.* (2007). Angegeben sind die Bootstrap-Wert (in %) an allen Knotenpunkten. CTG - Codon-Adaption, Translation von CTG durch Ser-tRNA. WGD - *whole genome duplication*.

Die evolutionäre Entwicklung der Saccharomycotina ist gekennzeichnet durch verschiedene markante Veränderungen, weshalb man diese Arten in verschiedene Kladen einteilen kann. Dabei kam es zum Beispiel vor ca. 170 Mio. Jahren zu einer Veränderung des genetischen Codes bei einem gemeinsamen Vorfahren der Klade, zu der heute unter anderem verschiedene *Candida*-Arten und *Debaryomyces hansenii* gehören (Abbildung 1, CTG; Massey *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2006). Eine weitere, weitreichende Veränderung war die Genomduplikation (WGD (*whole genome duplication*)) eines gemeinsamen Vorfahrens der *Saccharomyces*-Klade (Abbildung 1) vor ca. 100 bis 300 Mio. Jahren (Wolfe und Shields, 1997; Kellis *et al.*, 2004). Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich dabei um eine simple Duplikation des Genoms gehandelt hat (Autopolyploidie) (Gordon *et al.*, 2009). Neuere, phylogenomweite Untersuchungen ergaben jedoch, dass es bereits vor der eigentlichen WGD zu einer Verdopplung gekommen sein muss (Marcet-Houben und Gabaldon, 2015). Vermutlich kam es damals zur Hybridisierung zwischen einer Spezies der ZT-Klade (beinhaltet Spezies wie *Zygosaccharomyces rouxii* und *Torulaspora delbrueckii*) und einer Spezies aus einer unbekanntem Linie außerhalb der ZT- und KLE-Klade (beinhaltet Spezies wie *K. lactis*, *Lachancea waltii* und *Eremothecium gossypii*) (Abbildung 2, pre-KLE-branch). Bei Hybriden kommt es anschließend zu Genkonversionen, bei denen Teile der DNA eines Subgenoms durch Sequenzen des anderen Subgenoms ersetzt werden. Dies konnte auch für anderer hybride Hefespezies wie *Candida orthopsilosis* (Pryszcz *et al.*, 2014) und

*Pichia soritophila* (Louis *et al.*, 2012) sowie bei Pflanzenhybriden beobachtet werden (Freeling, 2009). Hybride Spezies sind jedoch unfruchtbar, da die Chromosomen der beiden Subgenome in der Meiose nicht miteinander paaren können. Marcet-Houben und Gabaldon (2015) beschreiben daher die in der *Saccharomyces*-Linie aufgetretene Genomduplikation als notwendig, um die Fertilität wiederherzustellen. Bei der WGD in dieser Linie handelt es sich daher vermutlich eher um eine Allopolyploidisierung. Etliche Untersuchungen haben zu dem Ergebnis geführt, dass Genomduplikationen zwar ein eher seltenes Ereignis sind, aber dennoch genauso bei der Evolution von Tieren und Pflanzen eine große Rolle gespielt haben. In fast allen eukaryotischen Genomen gibt es Hinweise auf solch ein Ereignis in einem Vorfahren (Review: Jaillon *et al.*, 2009). Genomduplikationen gehen mit einer enormen Steigerung der Genomgröße und -komplexität einher. Die daraus resultierende Erhöhung der genetischen Vielfalt ermöglicht wiederum die Anpassung an sich verändernde Lebensräume oder Umweltbedingungen.



**Abbildung 2: Ursprung einer Hybridisierung in der *Saccharomyces*-Klade.**

Phylogenetischer Stammbaum der in Marcet-Houben und Gabaldon (2015) analysierten Spezies. Farblich hervorgehoben sind Spezies der KLE- (orange), ZT- (gelb) und post-WGD-Klade (braun).

## 1.2. Konsequenzen der Genomduplikation für den Metabolismus der Hefen

Die Genomverdopplung in der *Saccharomyces*-Klade führte in erster Linie zu einer Verdopplung aller Gene von etwa 5.000 auf 10.000. Diese enorme Veränderung wirkt sich negativ auf die Genomstabilität aus (Storchova und Pellmann, 2004), daher gehen die

meisten duplizierten Gene nach solch einem Ereignis wieder verloren. Hypothesen besagen, dass nur wenn sich duplizierte Gene dahingehend entwickeln, dass sie neue Funktionen übernehmen können (Ohno, 1970) oder aber sich die Funktionen eines ursprünglich universalen Gens auf beide duplizierte Gene aufteilt (Force *et al.*, 1999), sie im Genom erhalten bleiben. Das heutige *S. cerevisiae*-Genom umfasst ca. 5.500 protein-kodierende Gene, davon stammen 1102 Gene aus 551 ohnologen Paaren (Byrne und Wolfe, 2005). Gehen duplizierte Gene verloren, hat dies auch einen Einfluss auf die Nachbarschaftsbeziehungen der Gene und deren Expression. Analysen zur WGD in *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, dass der Verlust eines duplizierten Gens nicht zufällig geschieht, sondern vielmehr in die Entstehung von „Gen-armen“ und „Gen-reichen“ Regionen der duplizierten Bereiche resultiert (Thomas *et al.*, 2006). Vergleicht man pre- und post-WGD-Hefen miteinander, wird ersichtlich, dass der Anteil divergent und konvergent transkribierter Gene nach der Genomduplikation prozentual kleiner geworden ist (Byrnes *et al.*, 2006). Daher kann man davon ausgehen, dass eine Genomduplikation und anschließender massiver Genverlust auch einen Einfluss auf die Expression benachbarter Gene und damit ebenso auf regulatorische und metabolische Signalnetzwerke hat.

Im Allgemeinen zeichnen sich pre- und post-WGD-Hefen durch einen unterschiedlich ausgeprägten Crabtree-Effekt aus. Der Crabtree-Effekt wurde erstmals von Herbert G. Crabtree beobachtet und beschreibt den Mechanismus in Tumorzellen, durch den Glukose auch in aeroben Bedingungen die Atmung inhibiert (Crabtree, 1929). Dieser Effekt kann auch in Hefen beobachtet werden (De Deken, 1966). Während Crabtree-positive Hefen (bei post-WGD-Spezies) Glukose auch unter aeroben Bedingungen fermentieren, betreiben Crabtree-negative Hefen (bei pre-WGD-Spezies) vorrangig Atmung (Merico *et al.*, 2007). Der evolutionäre Hintergrund, der zur Entstehung des Crabtree-Effekts in Hefen führte, konnte bisher nicht geklärt werden. Jedoch verdeutlichen neuere Untersuchungen inzwischen, dass ein *overflow*-Metabolismus der ursächliche Mechanismus hinter dem Crabtree-Effekt ist und grundlegend für die Evolution der aeroben Fermentation in Hefen war (Hagman und Piškur, 2015). Die Entstehung des *overflow*-Mechanismus trat evolutionär gesehen nach der Auseinanderentwicklung der *Kluyveromyces*- und *Saccharomyces*-Linie auf und liegt damit vor dem Ereignis der Genomduplikation (Hagman *et al.*, 2013). Dass sich der Crabtree-Effekt als vorteilhafte Eigenschaft in der Evolution durchgesetzt hat, ist aus energetischer Sicht ungewöhnlich, da durch Respiration eine deutlich höhere Energieausbeute erzielt werden

kann. Die Entwicklung der aeroben Fermentation ermöglichte jedoch eine schnelle Glukoseaufnahme und rapide, wenn auch ineffizientere, Verwertung der Glukose, um die Energieausbeute innerhalb kurzer Zeit zu maximieren. Die Entwicklung der Fermentation stellt daher einen Fitness-Vorteil gegenüber anderen Spezies dar, da den Konkurrenten, die zwar effizienter aber dafür langsamer respirieren, die Nahrungsgrundlage entzogen wird. Evolutionär spätere Ereignisse, wie die Genomduplikation, die Duplikation von Hexosetransportern (Lin und Li, 2011) oder die Entwicklung der Glukose-Repression, dienten vermutlich als einer Art „*fine-tuning*“ bei den Crabtree-positiven *Saccharomyces*- und *Kazachstania*-Hefen, um den *overflow*-Metabolismus zu steigern und um die Regulation von Fermentation und Respiration voneinander loszulösen (Hagman und Piškur, 2015). *In silico*-Untersuchungen haben gezeigt, dass in Folge einer Genomduplikation tatsächlich der Glykolyse-Flux in der Zelle gesteigert wird (Conant und Wolfe, 2007; van Hoeg und Hokeweg, 2009). Die Spezialisierung auf Fermentation führte außerdem zur Erhöhung der Ethanolproduktion, wobei aus der Zelle diffundierendes Ethanol wiederum toxisch für mikrobielle Konkurrenten ist, was erneut einen Fitness-Vorteil darstellt (Hagman und Piškur, 2015). Eine weit verbreitete Hypothese besagt, dass die Entwicklung des Crabtree-Effekts und die WGD wichtige Ereignisse für die Anpassung der Hefen an neue, glukosereiche Lebensräume war, die es nach der Entstehung der frucht-tragenden Angiospermen zu erschließen galt (Piškur und Langkjaer, 2004; Conant und Wolfe, 2007; Hagman *et al.*, 2013).

Zu verstehen, welche Mechanismen in Crabtree-positiven und Crabtree-negativen Hefen verantwortlich für die Ausprägung der unterschiedlichen Stoffwechsel sind, ist auch für die Krebsforschung relevant. Viele Krebszelltypen zeichnen sich dahingehen aus, dass die Energieproduktion unter aeroben Bedingungen über 50% aus der Milchsäuregärung stammt, während die Respiration vermindert abläuft (Warburg-Effekt; Warburg, 1924). Andere Krebszelltypen betreiben wiederum Atmung zur Energiegewinnung und wechseln zur aeroben Fermentation, wenn Glukose zur Verfügung steht (Crabtree-Effekt) (Rossignol *et al.*, 2004; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2008). Um die Mechanismen zu verstehen, die dem Crabtree-Effekt zugrunde liegen, ist *S. cerevisiae* ein gutes Modellsystem, da die Hefe einige metabolische Gemeinsamkeiten mit Tumorzellen aufweist (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). Der Crabtree-Effekt in höheren Eukaryoten ist zwar keine spezifische Eigenschaft von Tumorzellen und auch in anderen Zelltypen mit hoher Proliferationsrate anzutreffen (z.B. embryonale Stammzellen und Spermien; Wojtczak, 1996). Nichtsdestotrotz ist es von

großem Interesse zu verstehen, welche Mechanismen bei der Transformation einer gesunden Körperzelle in eine Tumorzelle zur Ausbildung des Crabtree-Effekts führen. Vergleichende Analysen zwischen *S. cerevisiae* und der Crabtree-negativen Hefe *K. lactis*, deren Metabolismus eher dem gesunder Zellen höherer Eukaryoten ähnelt, könnten dahingehend Einblicke gewähren.

### 1.3. Kohlenstoffmetabolismus in Hefen

In den meisten Hefen stellen Zucker die bevorzugten Kohlenstoffquellen zur Energiegewinnung dar, wobei dabei primär Glukose verstoffwechselt wird. Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus (Abbildung 3) an sich ist in Hefen hoch konserviert (Flores *et al.*, 2000). Nichtsdestotrotz haben unterschiedliche Lebensweisen verschiedener Hefespezies einen großen Einfluss auf die Art der Verwertung von Glukose. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den fakultativ anaeroben Hefen und kann Zucker wie Glukose oder Fruktose auch unter Sauerstoffmangel verstoffwechseln (Visser *et al.*, 1990). Eine Ausnahmen bildet dabei Trehalose, die nur unter Anwesenheit von Sauerstoff als Kohlenstoffquelle erschlossen werden kann (Kluyver-Effekt; Malluta *et al.*, 2000). Die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* hingegen kann unter strikt anaeroben Bedingungen nicht wachsen (Kiers *et al.*, 1996), da unter Sauerstoffentzug vermutlich die Biosynthese von Sterolen sowie deren extrazelluläre Aufnahme nicht stattfinden kann (Snoek und Steensma, 2006).

In Hefen wird Glukose über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg (PPP) umgesetzt. Ein sehr geringer Teil der verfügbaren Glukose kann zudem via Methylglyoxalweg abgebaut werden (in *S. cerevisiae* 0,3% der Glukose; Martins *et al.*, 2001). Alternative Verwertungsmöglichkeiten über Entner-Doudoroff- oder Phosphoketolase-Weg, die in Bakterien gut untersucht sind, konnten für Hefen nicht nachgewiesen werden (Blank *et al.*, 2005). Wieviel Glukose in Glykolyse oder PPP eingeschleust wird, hängt vermutlich mit dem NADPH-Bedarf der Zelle für anabole Biosyntheseprozesse zur Biomasseproduktion zusammen. So fließen in *S. cerevisiae* etwa 10% der verfügbaren Glukose in den PPP ein, wohingegen bei *K. lactis*, deren Biomasseproduktion 3-mal größer ist, ca. 40% der Glukose diesen Weg einschlagen (Blank *et al.*, 2005).



### 1.3.1. Verwertung von Glukose in *S. cerevisiae*

Wie bereits erwähnt, ist *S. cerevisiae* eine Crabtree-positive Hefe. Das bedeutet, dass Glukose auch unter Anwesenheit von Sauerstoff bevorzugt fermentiert wird. Die Atmung trägt lediglich zu 10% zur Energiegewinnung bei (González-Siso *et al.*, 1996). Frei verfügbare Glukose im umgebenden Medium wird durch Glukosetransporter der *HXT*-Familie wahrgenommen und über die Plasmamembran transportiert. In *S. cerevisiae* sind insgesamt 18 *HXT*-Gene vorhanden, die potentiell Glukose transportieren können (Breunig *et al.*, 2000). Metabolisch relevant sind allerdings lediglich sechs Hexosetransporter (*SxHxt1*, 2, 3, 4 und 6), die jeweils unterschiedliche Affinitäten zu Glukose aufweisen (Reifenberger *et al.*, 1997). Die Effektivität der Glukoseaufnahme bestimmt den glykolytischen Flux und ist damit ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt im Glukosemetabolismus (Galazzo und Bailey, 1990). Nach der Aufnahme von Glukose kann diese im Zytoplasma durch *ScGlk1*, *ScHxk1* oder *ScHxk2* phosphoryliert werden, wobei überwiegend *ScHxk2* unter Glukose aktiv ist (Gancedo *et al.*, 1977). *ScHxk2* ist zudem ein bi-funktionales Protein, welches neben seiner katalytischen Funktion auch als transkriptioneller Repressor an der Glukose-Repression beteiligt und damit ein wichtiger Regulator im Glukose-Signalweg ist (Reviews: Rolland *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2014). Glukose-6-phosphat wird zu 90% in die Glykolyse eingespeist und zu Pyruvat umgesetzt. Die anderen 10% Glukose-6-Phosphat werden über den PPP verstoffwechselt.

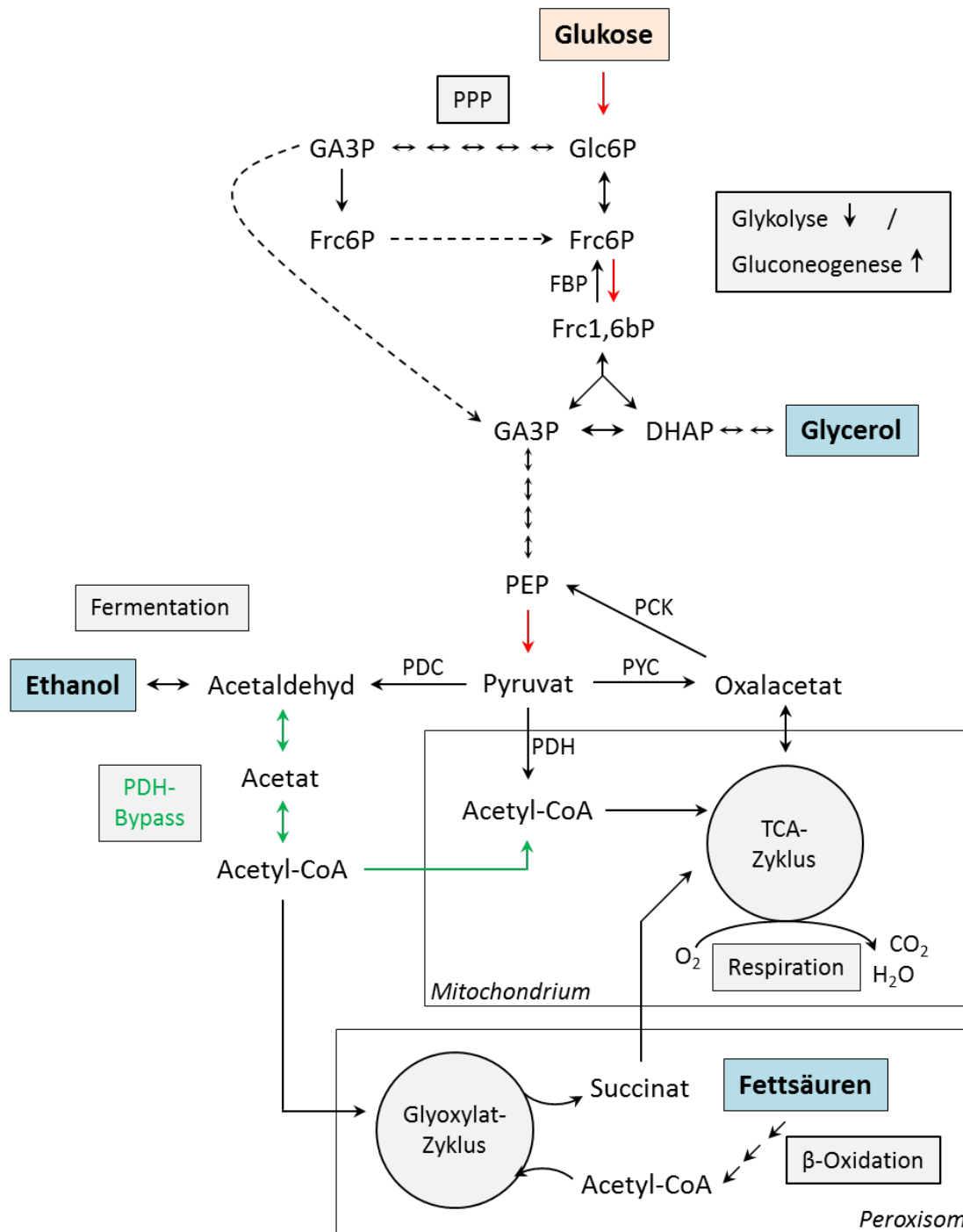
Die weitere Verstoffwechslung von Pyruvat stellt einen Scheideweg zwischen Respiration und Fermentation dar (Abbildung 3). In Abhängigkeit der gegebenen physiologischen Bedingungen kann Pyruvat zum einen im Mitochondrium durch den PDH-Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt und so dem TCA-Zyklus zugeführt werden. Zum anderen kann Pyruvat im Zytoplasma durch Pyruvatcarboxylasen zu Oxalacetat sowie durch Pyruvatdecarboxylasen zu Acetaldehyd umgewandelt werden. Letzteres wiederum fließt entweder in die alkoholische Gärung ein oder wird über den PDH-Bypass zu Acetyl-CoA abgebaut (Pronk *et al.*, 1996). Da die Kapazität der Pyruvatdecarboxylasen in *S. cerevisiae* 10-mal größer ist als die vom PDH-Komplex (Pronk *et al.*, 1996), wird der Flux von Pyruvat hin zur Bildung von Acetaldehyd getrieben. Die zytosolische NADH-abhängige Alkoholdehydrogenase *ScAdh1* setzt schlussendlich Acetaldehyd zu Ethanol um, wobei gleichzeitig das in der Glykolyse entstandenen NADH reoxidiert wird (Leskovac *et al.*, 2002). Der Flux von Acetaldehyd durch

den PDH-Bypass ist relativ gering (Rodrigues *et al.*, 2005). Nichtsdestotrotz sind der PDH-Bypass und die damit verbundene Produktion von Acetyl-CoA essentiell für das Zellwachstum (Flikweert *et al.*, 1996; van den Berg und Steensma, 1995). Während logarithmischer Wachstumsphasen benötigen Zellen Substrate des TCA-Zyklus, um zum Beispiel Aminosäurebiosynthese zu betreiben. Die Verwertung von Pyruvat über Pyruvatcarboxylasen spielt daher eine wichtige anaplerotische Rolle, um das fermentative Wachstum der Zelle zu erhalten.

Die Energieausbeute durch alkoholische Gärung ist sehr gering. Pro Molekül Glukose entstehen in der Nettogleichung lediglich 2 Moleküle ATP. Dieser geringe Energieertrag ist ausschlaggebend dafür, dass in *S. cerevisiae* unter Glukose-fermentierenden Bedingungen eine geringe Biomasseproduktion zu beobachten ist. Trotz der niedrigen Energieausbeute ist die alkoholische Gärung der bevorzugte Metabolismus für *S. cerevisiae*. Gene der Atmung und zur Verwertung anderer Kohlenstoffe sind durch Glukose reprimiert, was denn Fluss der Glukose in Richtung Fermentation treibt. Diese Lebensweise stellt eine sehr spezifische Adaption an Lebensräume mit hohem Glukosevorkommen dar, wie es zum Beispiel auf reifen Früchten der Fall ist. Die große Anzahl an Glukose-Transportern gewährleistet eine schnelle Aufnahme von viel Glukose, woraus ein hoher Glykolyse-Flux resultiert und die niedrige ATP-Ausbeute kompensiert werden kann. Doch gerade weil der Metabolismus von *S. cerevisiae* so speziell angepasst ist, lassen sich hier gewonnene Erkenntnisse nur bedingt auf höhere Eukaryoten übertragen.

### **1.3.2. Verwertung von Glukose in *K. lactis***

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist *K. lactis* eine Crabtree-negative Hefe, die Atmung vorrangig vor Fermentation betreibt (Pasteur-Effekt). Erst unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen werden die Prozesse der alkoholischen Gärung induziert (Kiers *et al.*, 1998). Zu natürlichen Habitaten von *K. lactis* gehören, wie der Name schon sagt, Molkereiprodukte, die weniger Glukose, dafür aber verschiedene andere Kohlenstoffquellen enthalten, hauptsächlich jedoch Laktose (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist *K. lactis* in der Lage, ein breites Spektrum an C-Quellen zu nutzen. Damit verbunden ist vermutlich auch ein allgemein höheres basales Expressionslevel von Stoffwechselgenen (persönliche Mitteilung K. Breunig). Die Glukose-Repression, wie sie in *S. cerevisiae* zu finden ist, ist in *K. lactis* nicht so stark ausgeprägt (Review: Breunig *et al.*, 2000).



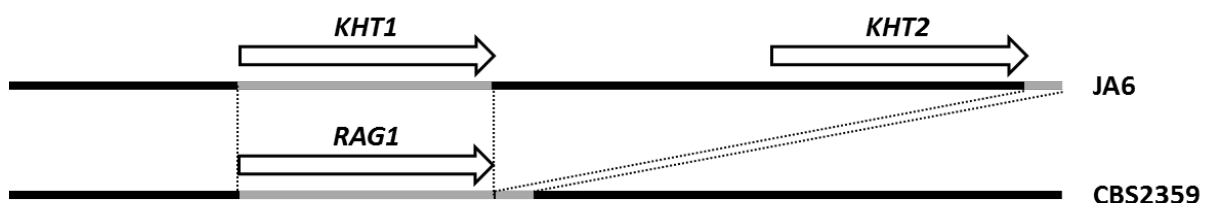
**Abbildung 3: Stoffwechselwege zur Verwertung von Glukose und alternativen C-Quellen.**

Schematische Darstellung zentraler Wege zur Verstoffwechslung von Glukose, Glycerol, Ethanol und Fettsäuren. Fermentierbare Kohlenstoffe sind orange, nicht-fermentierbare Kohlenstoffe blau hinterlegt. Rote Pfeile stellen irreversible Schritte der Glykolyse und grüne Pfeile den PDH-Bypass dar. Glc6P - Glukose-6-Phosphat, Frc6P - Fruktose-6-Phosphat, Frc1,6bP - Fruktose-1,6-bisphosphat, GA3P - Glycerinaldehyd-3-Phosphat, DHAP - Dihydroxyacetonphosphat, PEP - Phosphoenolpyruvat; PPP - Pentosephosphatweg, PCK - Pyruvatcarboxykinase, FBP - Fructose-1,6-Bisphosphatase, PDC - Pyruvatdecarboxylase, PYC - Pyruvatkinase, PDH - Pyruvatdehydrogenasekomplex. Schema von Rodrigues *et al.*, 2006, adaptiert.

Die Aufnahme von Glukose erfolgt auch in *K. lactis* über Hexosetransporter, wobei im Genom lediglich zwei Hexosetransporter kodiert sind. Der im Allgemeinen als

Referenzstamm angesehenen Stamm CBS2359, enthält ein *HXT*-Gen, *RAG1*, und *HGT1*, welches mit der *HXT*-Familie nur entfernt verwandt ist (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992; Billard *et al.*, 1996). Dabei kodieren *RAG1* und *HGT1* für Hexosetransporter mit niedriger bzw. hoher Affinität. Der *RAG1*-Lokus ist jedoch polymorph (Abbildung 4). So gibt es *K. lactis*-Stämme wie den in dieser Arbeit verwendeten JA6, die anstelle des *RAG1*-Gens *KHT1* und *KHT2* tragen, zwei Hexosetransporter der *HXT*-Familie, die zu 75% identisch sind. Dieser und weitere genomische Unterschiede tragen dazu bei, dass der Stamm JA6 eine stärkere Glukose-Repression zeigt (Review: Breunig *et al.*, 2000).

Im Zellinneren wird Glukose durch die Hexosekinase Rag5 oder *KlGk1* phosphoryliert, wobei Rag5 die Hauptfunktion innehat (Kettner *et al.*, 2007). Da der PPP in *K. lactis* im Vergleich zu *S. cerevisiae* eine höhere Kapazität hat, wird ein Großteil von Glukose-6-Phosphat in den PPP eingespeist und zur NADPH-Produktion genutzt (Jacoby *et al.*, 1993; Tarrío *et al.*, 2006a). *K. lactis* betreibt bevorzugt einen respiratorischen Stoffwechsel, weshalb Pyruvat hauptsächlich über den PDH-Komplex im Mitochondrium zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Der dafür notwendige Transport von Pyruvat in die Mitochondrien erfolgt über die mitochondrialen Pyruvat-Transportproteine, die in Hefen erst 2012 durch Herzig *et al.* in *S. cerevisiae* identifiziert wurden. Im PDH-Komplex erfolgt die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, wobei  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert wird. Eine Verstoffwechslung von Pyruvat über den PDH-Bypass scheint in *K. lactis* keine allzu große Rolle zu spielen, da *rag6* (Pyruvatdecarboxylase)-Mutanten auf Glukose kein gestörtes Wachstum zeigen (Bianchi *et al.*, 1996). Acetyl-CoA wird über den TCA-Zyklus verstoffwechselt. Dafür wird Acetyl-CoA zunächst auf Oxalacetat übertragen, wodurch Citrat entsteht. Diese Reaktion wird durch die mitochondrielle Citratsynthase *KlCit3* vermittelt.



**Abbildung 4: *RAG1*-Lokus der *Kluyveromyces lactis*-Stämme JA6 und CBS2359.**

Schematische Darstellung des polymorphen *RAG1*-Lokus. Im Stamm JA6 liegen die beiden für Hexosetransporter kodierenden Gene *KHT1* und *KHT2* tandemartig nebeneinander, wohingegen im Referenzstamm CBS2359 der *RAG1*-Lokus das einzelne, namensgebende Gen trägt. Die kodierende Sequenz von *RAG1* und *KHT1* sind identisch und der nicht-kodierende Bereich am 3'-Ende von *RAG1* ist nahezu identisch mit dem von *KHT2*. *RAG1* ist daher wahrscheinlich aus einem Rekombinationsereignis zwischen *KHT1* und *KHT2* entstanden.

Innerhalb von vier sich anschließenden enzymatischen Reaktionen findet zweimal eine Decarboxylierung statt, wodurch die beiden dem Acetyl-CoA entstammenden C-Atome jeweils zu Kohlenstoffdioxid umgesetzt werden. Diese beiden Schritte werden von der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat- und  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase unter Reduzierung von NAD<sup>+</sup> katalysiert. Abschließend wird das dabei entstandene Succinyl-CoA in vier weiteren Reaktionsschritten zu Oxalacetat regeneriert.

NADH und NADPH sind wichtige Reduktionsmittel, die auch bei der respiratorischen Verwertung von Glukose in *K. lactis* als Co-Faktoren benötigt werden. Für die Zelle ist es daher unabdingbar, das Gleichgewicht zwischen den reduzierten und oxidierten Formen aufrecht zu erhalten (Redox-Balance), damit metabolische Prozesse weiterhin ablaufen können und Wachstum überhaupt möglich ist. Die Regeneration des während der Glykolyse und des TCA-Zyklus entstandenen NADHs läuft über die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium der Zelle ab (Tarrío *et al.*, 2005), die gleichzeitig zur Energiegewinnung dient. In vielen Hefen fehlt der Multienzymkomplex I der Atmungskette (NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase, Joseph-Horne *et al.*, 2001). Stattdessen besitzt die Zelle alternative NADH-Dehydrogenasen, die Reduktionsäquivalente oxidieren und freigesetzte Elektronen auf Ubiquinon übertragen können. Zytoplasmatisches NADH wird von externen NADH-Dehydrogenasen oxidiert, die in *K. lactis*, nicht aber in *S. cerevisiae*, auch eine Substratspezifität für NADPH besitzen, wohingegen mitochondrielles NADH durch interne NADH-Dehydrogenasen zu NAD<sup>+</sup> regeneriert wird (Tarrío *et al.*, 2005; 2006b). Im Gegensatz zu Komplex I werden bei diesen Reaktionen allerdings keine Protonen in den perimitochondrialen Raum gepumpt (von Jagow und Klingenberg, 1970), weshalb pro Molekül Glukose insgesamt „nur“ 22 ATP-Moleküle synthetisiert werden. Dennoch ist die Energieausbeute durch Respiration dadurch 11-mal größer als durch Fermentation.

Das durch den PPP entstandene NADPH muss in der Zelle nicht zwingend durch oxidative Phosphorylierung regeneriert werden, da es für verschiedenste anabole Biosynthesewege als Coenzym benötigt wird. Hauptkonsumenten von NADPH sind vor allem Lipid- und Aminosäurebiosynthese. Abgesehen davon spielt NADPH zudem eine wichtige Rolle beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress, da es auch für Glutathion- und Thioredoxin-abhängige Enzyme ein essentieller Co-Faktor ist (Minard und McAlister-Henn, 2001; Slekar *et al.*, 1996). Die Reoxidierung von NADPH via oxidativer Phosphorylierung ist in der Zelle vermutlich nur

dann bedeutend, sobald mehr NADPH produziert wird, als durch anabole Reaktionen verbraucht werden kann (*Overflow-Mechanismus*; Melo *et al.*, 1999). Neben ihrem Nutzen zur Energiegewinnung und NAD(P)H-Produktion liefern Glykolyse, PPP und TCA-Zyklus außerdem zahlreiche Vorstufen für wichtige Biosynthese-Prozesse.

### 1.3.3. Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe

Neben Glukose und anderen Zuckern sind Hefen auch in der Lage, nicht-fermentierbare Kohlenstoffe als Energiequelle zu nutzen. Diese können entweder durch Diffusion (z.B. Ethanol, Acetat) oder durch aktiven Transport (z.B. Lactat, Glycerol; Casal *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2005) ins Zellinnere gelangen. Die Verwertung von Ethanol erfolgt durch zytosolische Alkoholdehydrogenasen, die die Umwandlung in Acetaldehyd katalysieren. Alkoholdehydrogenasen (ADHs) können diese Reaktion prinzipiell in beide Richtungen katalysieren. Jedoch bestimmen kinetische Eigenschaften sowie die Regulation der Transkription des jeweiligen Gens als auch die Lokalisierung der ADHs darüber, in welche Richtung das Gleichgewicht der Reaktion verschoben ist (Flores *et al.*, 2000). Für die Verwertung von Ethanol sind in *S. cerevisiae* ScAdh2 (Ciriacy *et al.*, 1975, 1979) und in *K. lactis* KlAdh1 sowie KlAdh2 (Saliola und Falcone, 1990; Shain *et al.*, 1992) verantwortlich. In zwei weiteren Reaktionen wird Acetaldehyd zu Acetyl-CoA umgesetzt (Abbildung 3). Acetyl-CoA kann dann zur Energiegewinnung in den TCA-Zyklus einfließen. Für das Wachstum der Zellen ist es jedoch unabdingbar, aus niedermolekularen Kohlenstoffen Zuckerphosphate herzustellen. Dies geschieht über die Gluconeogenese, die größtenteils aus der Umkehrung der Glykolyse besteht. Zwei Reaktionsschritte müssen jedoch durch Gluconeogenese-spezifische Enzyme katalysiert werden, da diese aus energetischen Gründen irreversibel sind. Dabei synthetisieren eine Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und eine Fructose-1,6-Bisphosphatase die Synthese von Phosphoenolpyruvat bzw. Fructose-6-Phosphat (Abbildung 3). Um die Gluconeogenese bei der Verwertung von C2-Körpern zu beliefern, ist der Glyoxylat-Zyklus von essentieller Bedeutung. Der Glyoxylat-Zyklus ähnelt dem TCA-Zyklus, findet aber in Hefen im Peroxisom oder Zytoplasma statt. Wie beim TCA-Zyklus wird Acetyl-CoA auf Oxalacetat übertragen, wodurch Citrat entsteht, welches wiederum in Isocitrat überführt wird. Eine Isocitratlyase spaltet nun allerdings, anders als beim TCA-Zyklus, Isocitrat in Succinat und Glyoxylat, wobei letzteres wieder zu Oxalacetat regeneriert wird. Succinat ist ein C4-Körper, der in den TCA-Zyklus einfließen und schließlich der

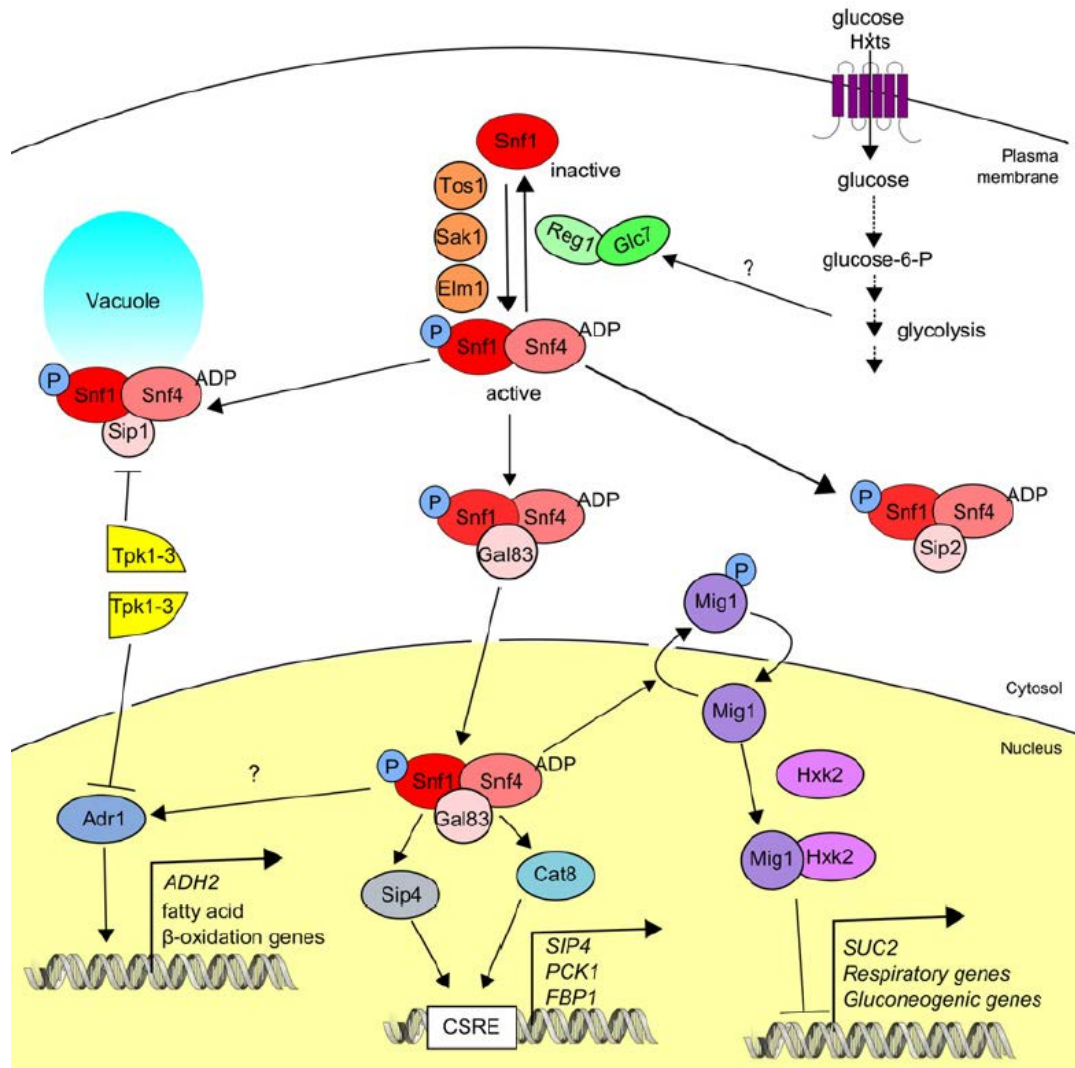
Gluconeogenese zugeführt werden kann. Der Glyoxylat-Zyklus hat damit eine anaplerotische Funktion, um den C4-Körper-Pool des TCA-Zyklus aufzufüllen, der für die Gluconeogenese verbraucht wird.

Neben Ethanol kann auch Glycerol als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Glycerol ist ein C3-Körper, der in der Zelle zunächst durch eine Glycerolkinase phosphoryliert und anschließend zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert wird, katalysiert durch eine FAD-abhängige Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase (Sprague und Cronan, 1977). Dihydroxyacetonphosphat kann sowohl in die Glykolyse und den TCA-Zyklus als auch in den oberen Teil der Gluconeogenese eingespeist werden (Abbildung 3). Die Verwertung von Glycerol erfolgt damit unabhängig vom Glyoxylat-Zyklus und vom unteren Teil der Gluconeogenese, bei dem die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase bedeutend ist. Die Fructose-1,6-Bisphosphatase hingegen im oberen Teil der Gluconeogenese ist sowohl für die Nutzung von C2- als auch C3-Körpern essentiell.

### **1.4. Regulation des Kohlenstoffmetabolismus über den Snf1-Signalweg**

Damit die Zelle auf Veränderungen hinsichtlich der Verfügbarkeit von Nährstoffen reagieren kann, haben sich verschiedenste Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe die adaptive Regulation metabolischer Stoffwechselwege erfolgt. Diese Mechanismen können auf transkriptioneller, post-transkriptioneller, translationeller sowie post-translationeller Ebene stattfinden und bilden ein komplexes genregulatorisches Netzwerk (für Reviews: Oliveira *et al.*, 2012; Tripodi *et al.*, 2013). Aufgrund der Spezialisierung auf Glukose als Kohlenstoffquelle hat sich in *S. cerevisiae* zum Beispiel die Glukose-Repression besonders stark ausgeprägt (Review: Conrad *et al.*, 2014; Kayikci und Nielsen, 2015). In Anwesenheit von Glukose werden dadurch Gene des Glukosestoffwechsels induziert sowie Gene der Atmung, Gene zur Verwertung alternativer C-Quellen als auch Gene der Gluconeogenese unterdrückt (Reviews: Klein *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2002). Kommt es allerdings zur Glukoselimitierung, läuft eine massive Umprogrammierung des Transkriptom ab, wobei u.a. die Glukose-vermittelte Repression von Genen aufgehoben und die Expression von Stoffwechselgenen anderer Kohlenstoffquellen induziert wird, um weiterhin Energie zu gewinnen (DeRisi *et al.*, 1997). Der zentrale Regulator des Energiestoffwechsels in Hefen ist der Snf1-Komplex, der in Antwort auf Energiemangel energieverbrauchende Prozesse hemmt und energieproduzierende Prozess induziert, um die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten (Carling, 2004; Kahn *et al.*, 2005). ScSnf1 ist eine Proteinkinase der AMPK-Familie,

die von Pilzen über Pflanzen (snRK) bis hin zu Säugern (AMPK) sowohl strukturell als auch funktionell hoch konserviert ist (Hedbacker und Carlson, 2008). In *S. cerevisiae* ist der Snf1-Komplex in die Aktivierung metabolischer (Atmung, Gluconeogenese, Glyoxylat-Zyklus und Fettsäure-Oxidation) und zellulärer Signalwege (Peroxisomenbiogenese, Autophagie und Alterung) aber auch in die Glukose-Repression involviert (Ashrafi *et al.*, 2000; Hedbacker und Carlson, 2008; Usaite *et al.*, 2009).



**Abbildung 5: Snf1-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*.**

Schematische Darstellung des Snf1-Signalwegs aus Conrad *et al.* (2014). Die katalytische Domäne von ScSnf1 wird bei Glukosemangel durch drei *upstream* Kinasen ScElm1, ScSak1 und ScTos3 phosphoryliert und damit aktiviert. Die Gegenreaktion wird Glukose-induziert durch die ScReg1-ScGlc7-Phosphatase katalysiert. In Abwesenheit von Glukose führt die Interaktion von ADP-ScSnf4 mit ScSnf1 zu einer Konformation mit erhöhter Phosphatase-Resistenz. Die gebundene regulatorische  $\beta$ -Untereinheit (ScSip1, ScSip2, ScGal83) entscheidet über die Lokalisierung und damit über ScSnf1-Substrate. Der nukleäre Snf1-Komplex führt zur Aufhebung der Glukose-Repression durch Phosphorylierung von ScMig1 und damit Auflösen des ScMig1-ScHxk2-Repressorkomplexes als auch zur Aktivierung von ScAdr1 und der CSRE-bindenden Transkriptionsfaktoren ScCat8 und ScSip4. Dadurch wird die Expression respiratorischer und gluconeogener Gene sowie von Genen zur Verwertung alternativer Kohlenstoffe wie Ethanol und Fettsäuren ScSnf1-abhängig induziert.



### Struktur und Regulation des Snf1-Komplexes

Der Snf1-Komplex ist ein heterotrimerer Komplex bestehend aus einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit ScSnf1, einer regulatorischen  $\gamma$ -Untereinheit ScSnf4 und einer  $\beta$ -Untereinheit (kodiert durch die drei Gene *ScSIP1*, *ScSIP2* und *ScGAL83*) (Amodeo *et al.*, 2007; Jiang und Carlson, 1997). Die  $\beta$ -Untereinheit bestimmt dabei die Lokalisierung des Snf1-Komplexes (Abbildung 5). ScSnf1 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die eine N-terminale Kinasedomäne und eine C-terminale Autoinhibierungsdomäne (AID) besitzt, die die Kinasedomäne blockiert. Die Aktivierung der Kinase erfolgt bei Glukosemangel durch die Phosphorylierung von Threonin 210 (T210) in der katalytischen Domäne durch die *upstream* Kinasen ScElm1, ScPak1 und ScTos3 (Hong *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 2003), wohingegen in Anwesenheit von Glukose die entsprechende Dephosphorylierung durch die ScReg1-ScGlc7 Phosphatase katalysiert wird (Tu und Carlson, 1995). Neuere Untersuchungen sprechen zudem den Proteinphosphatasen ScPtc1 und ScSit4 eine Rolle in der ScSnf1-Dephosphorylierung zu (Ruiz *et al.*, 2011, 2013).

Die Kinaseaktivität des ScSnf1-Komplexes unterliegt zudem einer allosterischen Regulation durch Adenin-Nukleotide und Glycogen (Momcilovic *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2011). Die strukturellen Grundlagen dieses Mechanismus wurden am AMPK-Komplex aus Säugern aufgeklärt (Li *et al.*, 2015). AMP bindet an die  $\gamma$ -Untereinheit des Komplexes, wobei eines dieser gebundenen AMPs außerdem an den Aktivierungs-Loop der  $\alpha$ -Untereinheit bindet. Infolge dessen kommt es zu einer Konformationsänderung des Aktivierungs-Loops, der nun mit der AID interagiert und die hemmende Wirkung der AID auf die Kinasedomäne auflöst. Die AMP-Bindung führt insgesamt zu einer kompakteren Konformation des AMPK-Komplexes, wodurch die aktivierende Phosphorylierung in der katalytischen Domäne vor Phosphatasen geschützt ist. ATP konkurriert mit AMP um die Bindung an der  $\gamma$ -Untereinheit und bewirkt eine offenere Konformation, die Phosphatasen den Zugang zum katalytischen Zentrum erlaubt. Außerdem wirkt sich die Bindung von Glycogen an die  $\beta$ -Untereinheit vom AMPK-Komplex negativ auf dessen Kinaseaktivität aus. Auch in Hefe existieren solche allosterischen Regulationsmechanismen. Die Bindung von Glycogen an die  $\beta$ -Untereinheit ScGal83 wirkt hemmend auf die ScSnf1-Aktivität (Momcilovic *et al.*, 2008). In *S. cerevisiae* vermittelt jedoch nicht AMP, sondern ADP, eine kompakte Konformation des Komplexes, die die ScSnf1-T210-Phosphoylierung vor Phosphatasen schützt (Mayer *et al.*, 2011;

Chandrashekarappa *et al.*, 2011). Neuere Untersuchungen stellen die Bedeutung von ScSnf4 hinsichtlich Nukleotid-Bindung in Frage und postulieren, dass vielmehr die Interaktion der ScSnf1-Kinasedomäne mit dem heterotrimeren Kern ausschlaggebend für Phosphatase-resistenz und damit für die Aktivierung der Kinase ist (Chandrashekarappa *et al.*, 2013).

### Regulation von Genexpression durch Chromatinstruktur

Nahezu 75-90% des eukaryotischen Genoms ist in Nukleosomen verpackt (van Holde, 1989). Die Nukleosomenstruktur am Promotor eines Gens spielt daher eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Genregulation. Dabei bestimmen die DNA-Sequenz selbst sowie post-translationalen Modifizierungen der Histone, wie kompakt die DNA an Histone gebunden und damit auch wie zugänglich DNA für Regulatoren und die Transkriptionmaschinerie ist (Review: Radman-Livaja und Rando, 2010). AT-reiche DNA-Sequenzen sind z.B. energetisch ungünstig, um von Nukleosomen umwunden zu werden (antinukleosomal), wodurch Nukleosomen-freie Regionen (NFRs) entstehen (Iyer und Struhl, 1995). Im Gegensatz dazu gibt es intrinsische DNA-Sequenzen, die von Nukleosomen bevorzugt werden. Dadurch entstehen zum einen Promotoren, die eine relativ offene Chromatinstruktur aufweisen und dadurch leichter zugänglich für Regulatoren sind (z.B. bei essentiellen oder rDNA-Genen). Auf der anderen Seite führt eine kompakte Chromatinstruktur an Promotoren von Genen, die nur unter bestimmten Bedingungen benötigt werden, zu eher geschlossenen Promotoren, an denen Nukleosomen und Regulatoren um die Bindung an DNA konkurrieren (Field *et al.*, 2008). Dabei spielen u.a. DNA-bindenden Proteine wie ScAbf1, ScReb1 und ScRap1 und Chromatin-Remodeling-Komplexe wie SWI/SNF oder der RSC-Komplex eine wichtige Rolle (Radman-Livaja und Rando, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass NFRs von bestimmten Histonvarianten (z.B. H2A.Z) flankiert werden, die vermutlich als eine Art Barriere fungieren und benachbarte Nukleosomen vom NFR fernhalten (Raisner *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2009). Zusätzlich beeinflussen Histonmodifizierungen wie Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen die Affinität zur DNA oder die Rekrutierung von Chromatin-assoziierten Faktoren (Reviews: Millar und Grunstein, 2006; Bannister und Kouzarides, 2011). Der Snf1-Komplex in *S. cerevisiae* etwa phosphoryliert Histon 3 am Serin 10 (H3S10), wodurch der SAGA-Komplex rekrutiert wird. Dieser wiederum vermittelt eine Acetylierung am H3K9, was zur Auflockerung der Chromatinstruktur und nachfolgend zur Rekrutierung der RNA Polymerase II führt (Abate *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2012).

### Regulation der Genexpression durch Transkriptionsaktivatoren

Bei Glukosemangel aktiviert der Snf1-Komplex verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFs). Zum einen hebt die Phosphorylierung des Repressors ScMig1 durch ScSnf1 die Glukose-Repression der Genexpression verschiedener respiratorischer und gluconeogener Gene auf (für Review: Conrad *et al.*, 2014). Zum anderen werden Transkriptionsaktivatoren aktiviert, die an der Regulation von Genen für die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe beteiligt sind. Dazu zählen die Zink-*cluster*-Proteine ScCat8 und ScSip4, die durch ScSnf1 phosphoryliert werden (Lesage *et al.*, 1996; Randez-Gil *et al.*, 1997), und ScAdr1, dessen DNA-Bindung und Aktivität ScSnf1-abhängig reguliert wird (Young *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2007). Auf die Bedeutung von ScAdr1 soll jedoch an anderer Stelle eingegangen werden (siehe Kapitel 1.5). ScCat8 und ScSip4 binden sequenzspezifisch sogenannte CSRE-Elemente (*carbon source-responsive element*) in Promotoren Glukose-reprimierter Gene. Die Deletion von ScCAT8, nicht aber die von ScSIP4, führt zum Wachstumsdefekt der Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen (Hedges *et al.*, 1995; Lesage *et al.*, 1996; Dimmer *et al.*, 2002), weshalb man auf eine unterschiedliche Bedeutung dieser TFs für die Gluconeogenese schließen kann. ScCat8 vermittelt die Expressionen von Genen der Gluconeogenese (z.B. ScFBP1, ScPCK1), des Glyoxylat-Zyklus (z.B. ScICL1, ScMLS1) sowie der Ethanolverwertung (z.B. ScACS1) (Brons *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2005) und reguliert außerdem die Expression von ScSIP4 (Haurie *et al.*, 2001; Soontorngun *et al.*, 2007). Obwohl man wusste, dass sowohl ScCat8 als auch ScSip4 an CSREs *upstream* von Glukose-reprimierten Genen binden (Vincent und Carlson, 1998; Rahner *et al.*, 1999), war die Bedeutung von ScSip4 lange unklar. Kürzlich konnte jedoch eine Rolle von ScSip4 als negativer Regulator der ScFBP1-, ScPCK1- und ScMLS1-Genexpression aufgezeigt werden (Mehlgarten *et al.*, 2015). Es wäre also möglich, dass ScCat8 und ScSip4 um die Bindung am CSRE in diesen Promotoren konkurrieren und das ScCat8/ScSip4-Verhältnis in der Zelle die Gluconeogeneserate beeinflusst. In die Regulation der Gluconeogenese, des TCA- und Glyoxylat-Zyklus als auch der Respiration ist ein komplexes Netzwerk von mindestens 10 Transkriptionsfaktoren involviert (Review: Turcotte *et al.*, 2010), letzteres hauptsächlich durch den HAP-Komplex. Einige dieser Gene werden durch verschiedene Faktoren co-reguliert (z.B. durch ScCat8 und ScAdr1 (Tachibana *et al.*, 2005) oder durch ScCat8 und ScRds2), wobei der Überlapp an gemeinsam regulierten Genen relativ gering ist. Zudem regulieren einige TFs zusätzlich die Expression anderer TFs. So beeinflussen ScCat8 und

ScRds2 die *ScSIP4*- und *ScMig1* sowie der HAP-Komplex die *ScCAT8*-Expression (Hedges *et al.*, 1995; Rahner *et al.*, 1996). Auch die *ScHAP4*-Induktion selbst ist abhängig von ScRds2 und *ScGsm1* (Soontorngun *et al.*, 2007; van Bakel *et al.*, 2008), was eine konzertierte Induktion von Gluconeogenese und Respiration ermöglicht.

### Snf1-Signalweg in *K. lactis*

Auch in *K. lactis* sind zentrale Komponenten des Snf1-Signalwegs konserviert. So konnten *FOG2* und *FOG1* als *K. lactis*-Homologe zu *ScSnf1* und *ScGal83/ScSip1/ScSip2* identifiziert werden (Goffrini *et al.*, 1996). *KIMig1* wurde als Repressor der *GAL/LAC*-Regulation beschrieben, hat allerdings keinen Einfluss auf die Expression von *KIINV1*, dem durch *ScMig1*-regulierten *ScSUC2*-Homolog (Cassart *et al.*, 1995; Dong und Dickson, 1997; Georis *et al.*, 1999). *KIMig1* wird zwar *KISnf1*-abhängig phosphoryliert (Rippert *et al.*, 2017), doch inwiefern *KIMig1* überhaupt eine Rolle für die an sich schwach ausgeprägte Glukose-Repression in *K. lactis* spielt, ist unbekannt. Des Weiteren wurden die Transkriptions-aktivatoren *KICat8*, *KISip4* und *KIAdr1* untersucht. Auf *KIAdr1* wird wieder an anderer Stelle näher eingegangen (siehe Kapitel 1.5). Die starke Konservierung der funktionell relevanten Domänen in *KICat8*, *KISip4* und *KISnf1* legen nahe, dass auch hier eine Phosphorylierung durch *KISnf1* die Aktivität der Aktivatoren beeinflusst (Charbon *et al.*, 2004; Mehlgarten *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz deuten bisher gewonnene Erkenntnisse darauf hin, dass sich das Snf1-Cat8-Sip4-Netzwerk in *S. cerevisiae* und *K. lactis* divergent entwickelt hat. Sowohl *KICat8* als auch *KISip4* werden für das Wachstum auf C2-Quellen wie Ethanol und Acetat, nicht aber für C3-Quellen wie Glycerol benötigt (Georis *et al.*, 2000; Mehlgarten *et al.*, 2015). Das zeigt auf, dass die Expression der Fructose-1,6-Bisphosphatase, kodiert durch *KIFBP1*, in *K. lactis* auf einen anderen Weg reguliert wird als in *S. cerevisiae*. *KICat8* beeinflusst die basale *LAC4*-Expression und die Induktion der *KISIP4*-, *KIACS1*-, *KIACS2*- und *KIJEN1*-Transkription (Lodi *et al.*, 2001; Krijger, 2002). Viele Gene, die in *S. cerevisiae* durch *ScCat8* aktiviert werden, sind jedoch in *K. lactis* von *KICat8*-unabhängig (Mehlgarten *et al.*, 2015). Die Bedeutung von *KICat8* beläuft sich daher vermutlich hauptsächlich auf die transkriptionelle Aktivierung von *KISIP4*. *KISip4* hingegen ist bedeutend für die Expression von Genen des Glyoxylat-Zyklus und des Carnitin-*Shuttles*, der den Transport von Acetyl-CoA zwischen Mitochondrium und Zytoplasma ermöglicht. Damit hat *KISip4* eine essentielle Bedeutung für den anabolen Stoffwechsel inne (Mehlgarten *et al.*, 2015). Auch in *K. lactis*

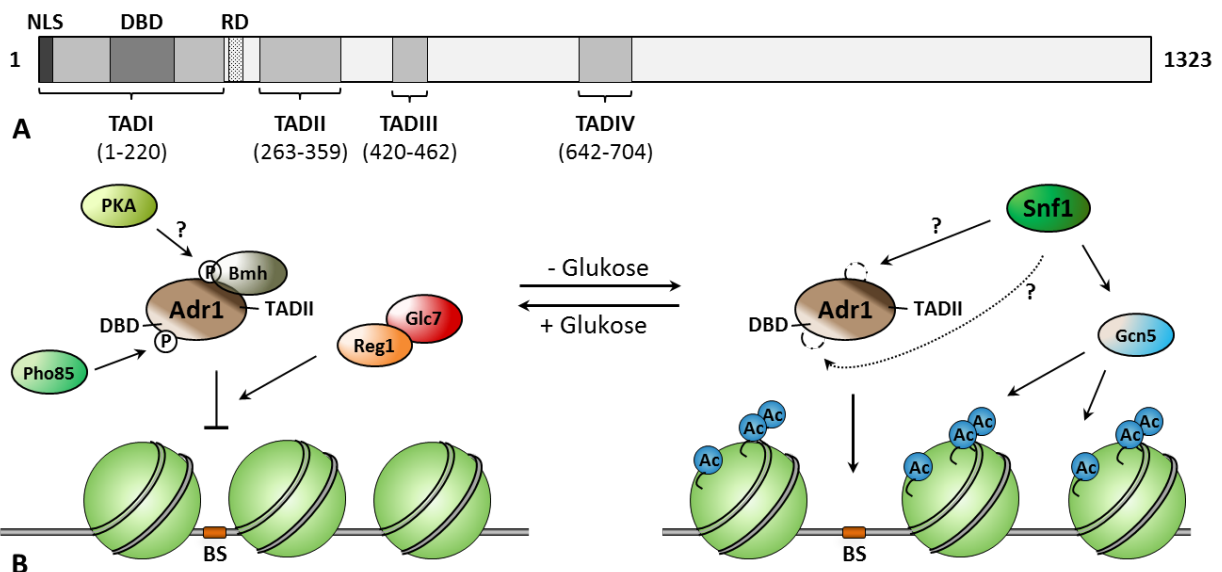
binden *K/Cat8* und *K/Sip4* gleichermaßen an bestimmte Promotoren (z.B. *KISIP4* und *LAC4*), weshalb auch hier eine konkurrierende Bindung der beiden TFs um das CSRE vorstellbar ist.

### 1.5. Regulation des Kohlenstoffmetabolismus durch Adr1

Der Transkriptionsfaktor Adr1 ist in *S. cerevisiae* ein Schlüsselregulator der Ethanol-Verwertung. *ScAdr1* wird für die transkriptionelle Aktivierung des glukose-reprimierten *ScADH2*-Gens benötigt, dessen Genprodukt die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd katalysiert (Ciriacy, 1975). Zudem ist *ScAdr1* in die Verwertung von Glycerol und Fettsäuren (Simon *et al.*, 1991; Young *et al.*, 2003) sowie in Peroxisomenbiogenese involviert (Simon *et al.*, 1992; Gurvitz *et al.*, 2001). Einige dieser Gene werden durch *ScAdr1* und *ScCat8*, *ScRds2* oder *ScOaf1/ScPip2* co-reguliert (Young *et al.*, 2003; Tachbiana *et al.*, 2005; Ratnakumar und Young, 2010; Soontorngun *et al.*, 2012). *ScAdr1* bindet als Monomer spezifisch an DNA mit der Konsensussequenz 5'-TGGRG-3' (Thukral *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1994). Die DNA-Bindedomäne (DBD) von *ScAdr1* ist charakterisiert durch zwei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger motive (AS 104-126 und AS 132-155) und eine PAR (*proximal accessory region*)-Region, die wichtig für eine hoch affine Bindung ist (Thukral *et al.*, 1989; Bowers *et al.*, 1999). Zudem wurden für *ScAdr1* vier Transkriptionsaktivierungsdomänen (TADs) beschrieben (Cook *et al.*, 1994a; Simon *et al.*, 1995), die mit TFIIB und der Histonacetyltransferase *ScGcn5* interagieren können (Abbildung 6A; Chiang *et al.*, 1996). Außerdem zeichnet sich der TF durch eine regulatorische Domäne (RD) aus, innerhalb derer Mutationen zu einem konstitutiv aktiven *ScAdr1* (*ScAdr1<sup>c</sup>*) führen (Ciriacy, 1976, 1979; Denis *et al.*, 1986, 1991, 1992).

Die Regulation der *ScAdr1*-Aktivität erfolgt *ScSnf1*-abhängig auf Ebene der DNA-Bindung und der Transkriptionsaktivierungsfähigkeit (Abbildung 6B). Die Phosphorylierung von Ser98 in der DNA-Bindedomäne, die indirekt durch die Cyclin-abhängige Kinase *ScPho85* reguliert wird, bewirkt in Anwesenheit von Glukose eine Reduzierung der Bindung des TFs an DNA (Kacherovsky *et al.*, 2008). Dabei trägt auch die *ScReg1/ScGlc7*-Phosphatase zur Inhibierung der DNA-Bindung bei (Young *et al.*, 2002). In Abwesenheit von Glukose ist die *ScAdr1*-Bindung an Promotoren abhängig von *ScSnf1* (Young *et al.*, 2002). *ScSnf1* vermittelt die Acetylierung von Nukleosomen an *ScAdr1*-abhängigen Promotoren durch *ScGcn5*, wodurch Adr1-Bindestellen für den TF zugänglich werden (Verdone *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2007; Abate *et al.*, 2012). Gebundenes *ScAdr1* ist dann in der Lage, den Präinitiationskomplex zu rekrutieren, wobei die Transkription erst dann initiiert wird, wenn *ScSnf1* aktiv

ist (Tachibana *et al.*, 2007). Dafür verantwortlich ist die Regulierung der Transkriptionsaktivierungsfähigkeit von ScAdr1. In reprimierenden Bedingungen wird Ser230 innerhalb der RD (Abbildung 6B) phosphoryliert. Bis heute ist umstritten, ob die PKA für diese Phosphorylierung verantwortlich ist (Cherry *et al.*, 1989; Denis *et al.*, 1992; Dombek und Young, 1997; Ratnakumar *et al.*, 2009). Diese Phosphorylierung wird von Bmh (14-3-3)-Proteinen gebunden und inhibiert die TADII (Parua *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2013). Bmh-Proteine sind hoch konservierte Proteine, die in Eukaryoten eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion verschiedener Prozesse spielen (Reviews: Aitken, 2006; van Heusden, 2009). Die Dephosphorylierung von Ser230 und die damit einhergehende Aufhebung der Bmh-Repression sind ScSnf1-abhängig, aber der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt (Ratnakumar *et al.*, 2009). An einigen von ScAdr1 und ScCat8 co-regulierten Genen scheinen Bmh-Proteine zudem als Modulatoren der kombinatorischen Genexpression zu wirken (Parua *et al.*, 2014).



**Abbildung 6: Struktur und Regulation von Adr1 in *S. cerevisiae*.**

**A.** Schematische Darstellung funktionell relevanter Domänen von ScAdr1. Das Protein enthält eine NLS (Kernlokalisierungssignal; AS 1-16 (Blumberg, 1987), eine DNA-Bindedomäne (AS 84-160), eine regulatorische Domäne (RD; AS 227-239) sowie vier Transkriptionsaktivierungsdomänen (TAD). **B.** Regulierung der Bindung von und der Aktivierung durch ScAdr1. In Glukose wird Ser98 in der DNA-Bindedomäne (DBD) phosphoryliert, was indirekt von ScPho85 abhängig ist. Die Phosphorylierung sowie ScReg1/ScGlc7 wirken hemmend auf die Bindung von ScAdr1 an seine Bindestelle (BS). Eine weitere Phosphorylierung an Ser230 in der RD, möglicherweise durch die PKA, führt zur Bindung von Bmh-Proteinen, die TADII verdecken und inaktiv halten. Bei Glukosemangel induziert ScSnf1 eine ScGcn5-vermittelte Hyperacetylierung der Promotornukleosomen und ermöglicht damit die Bindung von ScAdr1. Möglicherweise spielt ScSnf1 eine weitere Rolle in der Dephosphorylierung von Ser98. ScSnf1 beeinflusst zudem die Ser230-Dephosphorylierung und löst damit die Hemmung der TAD auf.

Der TF Adr1 ist anscheinend auch in *K. lactis* konserviert. Bereits 1995 zeigten Untersuchungen zur basalen Expression von *LAC4*, das für eine  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, dass eine Adr1-Bindestelle im Promotor Einfluss auf die Transkription des Gens in nicht-fermentierbaren C-Quellen hat (Schmidt, 1995). Das war der erste Hinweis auf ein Protein, dass über Adr1-Bindesequenzen in die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus involviert ist. Die Sequenzierung des Genoms von *K. lactis* ermöglichte schließlich die Identifizierung eines putativen ScAdr1-Homologs in der Milchhefe (Dujon *et al.*, 2004; Bussereau *et al.*, 2006; Sherman *et al.*, 2009). Doch welche Bedeutung dem TF in *K. lactis* tatsächlich zukommt, wurde bis zur Anfertigung dieser Arbeit nicht näher analysiert.

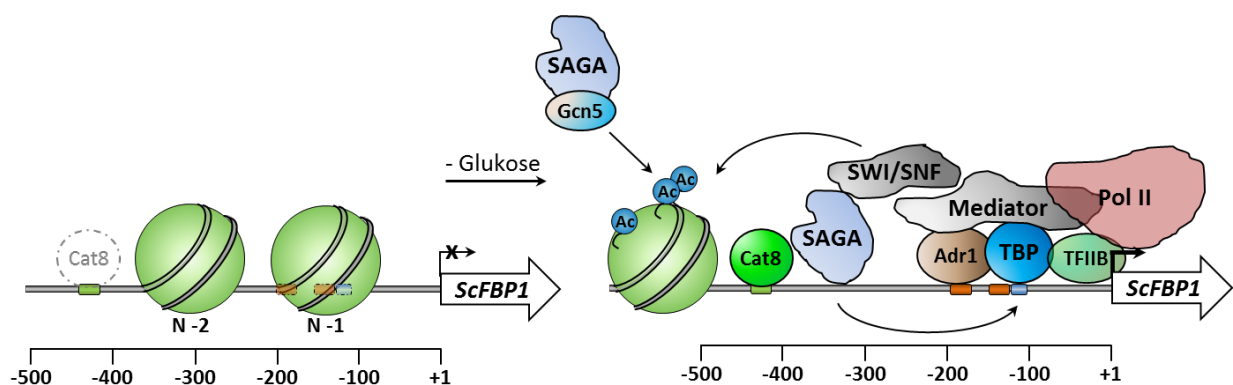
### **1.6. *FBP1* - ein Schlüsselgen der Gluconeogenese**

Die Fructose-1,6-Bisphosphatase (Fbp1) ist ein gluconeogenese-spezifisches Enzym, das die Synthese von Fructose-6-Phosphat aus Fructose-1,6-Bisphosphat katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion sowie daraus entstehende Zuckerphosphate sind essentiell für verschiedenste Biosynthesewege und somit für das Wachstum der Zelle. Damit in Anwesenheit von Zuckern Glykolyse und Gluconeogenese nicht gleichzeitig ablaufen, werden die Enzyme der Gluconeogenese sowie deren Genexpression durch verschiedenste Mechanismen beeinflusst. Dazu gehören für ScFbp1 in *S. cerevisiae* u.a. die Regulation der mRNA-Stabilität, allosterische Regulation durch AMP und Fructose-2,6-Bisphosphat sowie post-translationale Modifizierungen, die die Enzymaktivität adressieren oder als Degradierungssignal fungieren (für Reviews: Oliveira *et al.*, 2012; Tripodi *et al.*, 2015).

Die Regulation der *ScFBP1*-Expression auf transkriptioneller Ebene erfolgt über verschiedene Transkriptionsaktivatoren, Veränderungen der Chromatinstruktur und Rekrutierung von Co-Aktivatoren (Abbildung 7; Biddick *et al.*, 2008a, 2008b). Die Transkriptionsaktivatoren ScCat8 und ScAdr1 co-regulieren die Expression von *ScFBP1* (Young *et al.*, 2003). Deletionsanalysen im Promotor zeigten außerdem einen möglichen Einfluss von ScMig1 und des HAP-Komplexes auf die Transkriptionsaktivierung, wobei insbesondere die Rolle von ScMig1 kontrovers diskutiert wird (Mercado und Gancedo, 1992; Hedges *et al.*, 1995). Neben ScCat8 sind auch die CSRE-bindenden Faktoren ScRds2, ScErt1 und ScSip4 an der Regulation der *ScFBP1*-Expression beteiligt, wobei ScSip4 als Repressor wirkt und eventuell mit ScCat8 um die DNA-Bindung konkurriert (Soontorngun *et al.*, 2007; Gasmi *et al.*, 2014; Mehlgarten *et al.*, 2015). Biddick *et al.* (2008a) konnten zeigen, dass ScCat8 und ScAdr1 für die Rekrutierung

von Co-Aktivatoren benötigt werden, wobei ScCat8 am *ScFBP1*-Promotor vermutlich die größere Rolle spielt, da dessen Bindestelle nicht von Nukleosomen bedeckt ist (Abbildung 7). Der co-aktivierende SAGA-Komplex hat neben seiner Sgcn5-vermittelten Histonacetylierungsfunktion vermutlich eine weitere Bedeutung für die Rekrutierung des TATA-Box-Bindeproteins (TBP; Dudley *et al.*, 1999). Der Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF ist wichtig für die Verdrängung der positionierten -2 und -1 Nukleosomen und vermittelt damit die Zugänglichkeit der Adr1- und TBP-Bindestellen für die jeweiligen TFs. Auch der Mediator wird an den *ScFBP1*-Promotor rekrutiert und als Co-Aktivator der Genexpression benötigt. Zudem bewirkt die Deletion von *ScMAF1*, das für einen negativen Regulator der RNA-Polymerase III kodiert, eine Verringerung der *ScFBP1*-Expression (Morawiec *et al.*, 2013). Inwiefern ScMaf1 direkt oder indirekt an dieser Regulation beteiligt ist, muss jedoch noch untersucht werden.

In *S. cerevisiae* erfolgt die transkriptionelle Regulation der *ScFBP1*-Expression also durch ein komplexes Netzwerk aus Aktivatoren und Co-Aktivatoren, die gemeinsam eine Aktivierung bewerkstelligen. In *K. lactis* hingegen konnte bisher nur eine K/Snf1-Abhängigkeit der *KIFBP1*-Expression nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, C. Mehlgarten). Wie bereits beschrieben, wirken weder KICat8 noch KISip4 regulierend am *KIFBP1*-Promotor und *KICAT8*-Deletionsstämme können sogar uneingeschränkt auf C3-Körpern wie Glycerol wachsen (Georis *et al.*, 2000; Mehlgarten *et al.*, 2015). Anscheinend erfolgt die Regulation von *KIFBP1* in *K. lactis* über einen anderen Mechanismus als in *S. cerevisiae*.



**Abbildung 7: Transkriptionelle Regulation der *ScFBP1*-Expression.**

Schematische Darstellung der komplexen Vorgänge am *ScFBP1*-Promotor, die zur vollständigen Aktivierung der Genexpression führen. In Anwesenheit von Glukose liegt ScCat8 nicht in der Zelle vor. Zusätzlich überdeckt das -1 Nukleosom (N -1) die Bindestellen für ScAdr1 und TBP, weshalb die *ScFBP1*-Expression reprimiert ist. Bei Glukosemangel rekrutieren ScCat8 und ScAdr1 Co-Aktivatoren (SWI/SNF, SAGA-Komplex und Mediator) an den Promotor. SAGA ist nötig für die Acetylierung der Nukleosomen sowie die Rekrutierung von TBP, das wiederum weitere Faktoren der Transkriptionsmaschinerie rekrutiert (z.B. TFIIB und Pol II). Abbildung aus Biddick *et al.* (2008b), adaptiert.



### 1.7. Zielstellung dieser Arbeit

Die Verwertung von Kohlenstoffen dient allen Lebewesen zur Energiegewinnung und Biomasseproduktion. Die transkriptionelle Regulation des Kohlenstoffmetabolismus im Modellorganismus *S. cerevisiae* ist bereits gut untersucht. Jedoch lassen sich hier gewonnene Erkenntnisse nur bedingt auf höhere Eukaryoten übertragen, da der Stoffwechsel von *S. cerevisiae* hochgradig auf die effiziente Verwertung von Glukose durch Fermentation spezialisiert ist. Höhere Eukaryoten verstoffwechseln Glukose hingegen vorzugsweise respiratorisch, wie es auch für *K. lactis* der Fall ist. Bedingt durch Glukose-limitierung kommt es in der Zelle zu umfangreichen Veränderungen des Transkriptoms, um alternative Kohlenstoffe als Energiequelle zu erschließen.

Bisherige Untersuchungen geschahen in Betrachtung des diauxischen *Shifts*, bei dem die Glukosekonzentration allmählich absinkt und die Zellen langsam an die Glukoseverarmung adaptieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst einen grundsätzlichen Einblick dahingehend zu bekommen, wie sich plötzlicher Glukosemangel und das Zuführen der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen Ethanol beziehungsweise Glycerol auf das Transkriptom von *K. lactis* auswirken. Dabei wurde der Schwerpunkt auf Veränderungen der Expression von Genen des Kohlenstoffmetabolismus gelegt. Diese Analysen sollten zudem Aufschluss darüber geben, ob ethanol- oder glycerol-spezifische Unterschiede auszumachen sind.

In *S. cerevisiae* ist der Transkriptionsfaktor ScAdr1 ein Schlüsselregulator der Ethanol- und Glycerol-Verwertung. Der zweite Teil dieser Arbeit adressiert daher die Frage nach der Bedeutung von Adr1 in *K. lactis* (*KIAdr1*) hinsichtlich der transkriptionellen Regulation von Genen des Kohlenstoffmetabolismus. Dabei konnte u.a. eine *KIAdr1*-abhängige Repression des Isocitratlyase-Gens (*KIICL1*) durch Glycerol beobachtet werden. In nachfolgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, wie diese Repression durch *KIAdr1* vermittelt wird.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die transkriptionelle Regulation des gluconeogenischen Schlüsselenzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase, kodiert durch *KIFBP1*, in *K. lactis* analysiert werden. Dieses Gen ist sowohl für die Verwertung von Ethanol als auch von Glycerol essentiell. Bisherige Untersuchungen zeigten auf, dass die Regulation der *KIFBP1*-Expression zwar in Abhängigkeit der *KISnf1*-Kinase erfolgt, ansonsten aber in *K. lactis* verschieden von der in *S. cerevisiae* ist. Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Identifizierung von *cis*-regulatorischen Promotorelementen und *in trans* wirkenden Faktoren, die an der Vermittlung der *KISnf1*-abhängige Induktion der *KIFBP1*-Expression beteiligt sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Hefe-Stämme und Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *K. lactis* und *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C in Vollmedium (YEP: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton) oder Minimalmedium (YNB: 0,67% yeast nitrogen base) unter Zugabe von Adenin (11,2 mg/l), Uracil (38,4 mg/l), Histidin (38,4 mg/l), Tryptophan (38,4 mg/l), Arginin (38,4 mg/l), Methionin (38,4 mg/l), Tyrosin (14,4 mg/l), Leucin (57,6 mg/l), Isoleucin (57,6 mg/l), Phenylalanin (57,6 mg/l), Valin (57,6 mg/l), Threonin (57,6 mg/l) und Lysin (30 mg/l) in Form eines Aminosäure/Basen-Mixes (AS/B). Zur Selektion auf Plasmid-enthaltende Hefezellen wurde ein AS/B-Mix ohne entsprechender Aminosäure bzw. Base verwendet. Als Kohlenstoffquellen dienten 2% (w/v) Glukose, 3% (v/v) Ethanol oder 3% Glycerol (v/v). Für feste Medien wurde zusätzlich 2% (w/v) Agar hinzugefügt. Alle Medien wurden vor Zugabe von AS/B-Mix und Kohlenstoffquelle für 20 min bei 121°C autoklaviert. Der AS/B-Mix wurde 20-fach konzentriert hergestellt und für 5 min, Glukose und Glycerol jeweils 10-fach konzentriert für 10 min bei 121°C autoklaviert.

##### 2.1.1.1. *Kluyveromyces lactis*-Stämme und Genbezeichnung in *K. lactis*

In dieser Arbeit verwendete und selbst konstruierte Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die meisten Gene sind in *K. lactis* nicht annotiert, aber deren mögliche Funktion kann aufgrund von Syntenie-Beziehungen oder Sequenzhomologie zu *S. cerevisiae* erschlossen werden. Zur Förderung des Verständnisses wurden daher die gängigen Locus-Namen aus *K. lactis* durch die Namen der orthologen Gene aus *S. cerevisiae* ersetzt (Übersicht in Tabelle A9).

**Tabelle 1: Verwendete *K. lactis*-Stämme**

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JA6	MAT $\alpha$ <i>ade1-600 adeT-600 trp1-11 ura3-12 LAC9-2</i>	Breunig und Kuger, 1987
KB6-2C	MAT $\alpha$ <i>ura3-12 his3-35 ade<sup>-</sup></i>	Breunig
JSD1	wie JA6, aber <i>snf1::ScURA3</i>	Mehlgarten
JSD1R	wie JA6, aber <i>snf1::Scura3</i>	Mehlgarten
JA6/DS4	wie JA6, aber <i>sip4<math>\Delta</math></i>	Krijger, 2002
JA6/S4HA	wie JA6, aber <i>SIP4-(HA)<sub>6</sub>-KITRP1</i>	Mehlgarten <i>et al.</i> , 2015
yIG8	wie JA6, aber <i>cat8<math>\Delta</math></i>	Georis <i>et al.</i> , 2000
AKY2	wie KB6-2C, aber <i>UAS<sub>KIFBP1</sub>-HIS3 ura3::UAS<sub>KIFBP1</sub>-KanR</i>	Köppen, 2015

**in dieser Arbeit konstruierte Stämme**

Stamm	Relevanter Genotyp und Konstruktion
KSY8	wie JA6, aber <i>hap4::ScURA3</i> Integration eines PCR-Fragments (amplifiziert mit XY46 und XY72 an pXY66) in JA6
KSY11	wie JA6, aber <i>adr1::ScURA3</i> ; Integration eines PCR-Fragments (amplifiziert mit M13_FW und XY20 an pXY62) in JA6 (pXY62 siehe Tabelle A1C; siehe Abbildung 16)
KSY12	wie JA6, aber <i>hap4::Scura3</i> FOA-Selektion von KSY8 auf Uracil-Auxotrophie
KSY13	wie JA6, aber <i>adr1::Scura3</i> FOA-Selektion von KSY11 auf Uracil-Auxotrophie
KSY25	wie JA6, aber <i>sip4Δ adr1::ScURA3</i> Integration eines PCR-Fragments (amplifiziert mit M13_FW und XY20 an pXY62) in JA6/DS4 (analog zu KSY11)
KSY31	wie JA6, aber <i>SIP4-(HA)<sub>6</sub>-KITRP1 adr1::ScURA3</i> Integration von mit <i>Bsp1407I</i> und <i>Bpu1102I</i> linearisiertem pGP3HA in KSY11
KSY33	wie JA6, aber <i>(HA)<sub>3</sub>-ADR1</i> Integration von mit <i>EheI</i> und <i>EcoRV</i> linearisiertem pXY86 in KSY11 (s. Abbildung 21)
KSY43	wie JA6, aber <i>gal4::KanMX</i> Integration von mit <i>XbaI</i> linearisiertem pXY112 in JA6 (s. Abbildung 30A)
KSY44	wie JA6, aber <i>adr1::Scura3 gal4::KanMX</i> Integration von mit <i>XbaI</i> linearisiertem pXY112 in KSY13 (analog zu KSY43)
KSY53	wie JA6, aber <i>(HA)<sub>3</sub>-ADR1-P108L</i> Integration von mit <i>EheI</i> und <i>EcoRV</i> linearisiertem pXY125 (analog zu KSY33)
KSY54	wie JA6, aber <i>(HA)<sub>3</sub>-ADR1-P118L</i> Integration von mit <i>EheI</i> und <i>EcoRV</i> linearisiertem pXY126 (analog zu KSY33)
KSY56	wie JA6, aber <i>gal4Δ::KanMX snf1ΔR</i> Integration von mit <i>XbaI</i> linearisiertem pXY112 in JSD1R (analog zu KSY43)

**2.1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme**

**Tabelle 2: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme**

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
W303-1a	Mat a <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	Thomas und Rothstein (1989)
LL20	Mat α <i>leu2-3,112 his3-11,15 can1</i>	Jablonowski <i>et al.</i> , 2001
<i>fbp1::KanMX</i>	BY4741-Stamm mit <i>fbp1::KanMX</i>	Euroscarf
CMY178	wie W303, aber <i>snf1::ScURA3</i>	Mehlgarten
CMY186	wie W303, aber <i>adr1::KILEU2</i>	Mehlgarten
CMY187	wie W303, aber <i>sip4::KILEU2</i>	Mehlgarten

**in dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae*-Stämme**

Stamm	Relevanter Genotyp und Konstruktion
KSY27	wie W303, aber <i>sip4::SpHIS5 adr1::ScURA3</i> Integration eines PCR-Fragments mit 50 bp Überhängen für <i>ScSIP4</i> -Lokus (amplifiziert mit <i>ScSIP4-KO_F</i> und <i>ScSIP4-KO_R</i> an YDpSpHIS5) in CMY186

### 2.1.1.3. *Escherichia coli*-Stämme

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB (*lysogeny broth*)-Medium (1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) bei 37°C. Dem Medium wurde zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz 50 µg/ml (nach Klonierungen) oder 100 µg/ml (nach einfacher Plasmid-Transformation) Ampicillin bzw. zur Selektion auf Kanamycin-Resistenz 34 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt.

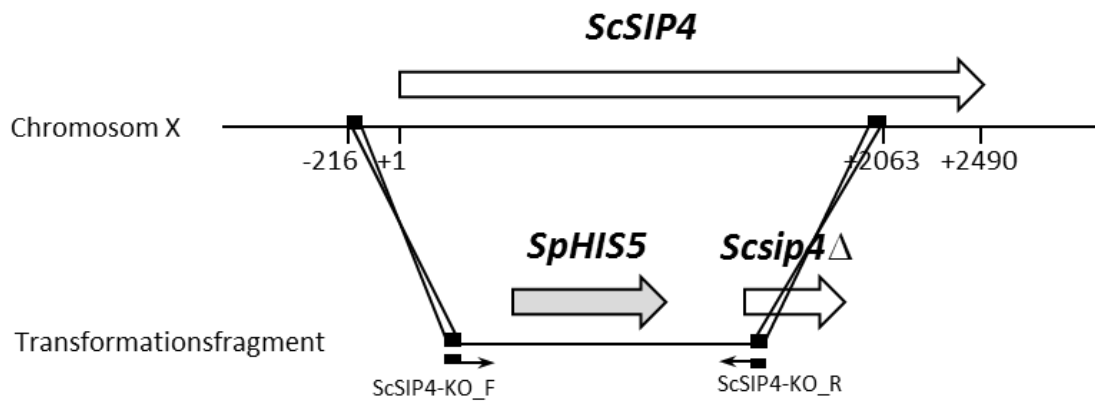
**Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme**

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	<i>F- ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>	Invitrogen

### 2.1.2. Konstruktion von Hefestämmen durch *gene replacement*

In *K. lactis* erfolgte das *gene replacement* durch Transformation von linearen Plasmidfragmenten oder PCR-Produkten. Bei Verwendung von Plasmiden wurden 4 µg Plasmid-DNA in einem 100 µl-Restriktionsansatz linearisiert, gefällt und in 20 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert. Für die Transformation von PCR-Produkten wurden drei 100 µl-PCR-Ansätze vereint, gefällt und ebenso in 20 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle A2 mit (K) gekennzeichnet. Die Transformation des gesamten Eluats erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Zur Selektion Uracil-auxotropher Zellen wurde der Transformationsansatz auf YEPD ausplattiert, über Nacht bei 18°C inkubiert und am nächsten Morgen auf FOA-Platten (siehe 2.1.1) überstempelt. Zum Nachweis einer ortsspezifischen Integration wurden Test-PCR-Analysen über Kolonie-PCR und an chromosomaler DNA durchgeführt (verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle A2, mit (N) gekennzeichnet). Zum Ausschluss von Mehrfachintegrationen wurden zudem *Southern Blot*-Analysen durchgeführt (siehe 2.2.2.5.16). Die zur Herstellung der Sonde verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle A2 mit (S) gekennzeichnet.

In *S. cerevisiae* erfolgte das *gene replacement* von *ScSIP4* durch Transformation eines PCR-Produkts, wobei dieses Primer-vermittelt 50 bp-lange homologe Bereiche zu *ScSIP4* aufweist (Abbildung 8). Der Nachweis einer ortsspezifischen Integration erfolgte über Test-PCR-Analysen mit den in Tabelle A2 mit (N) angegebenen Oligonukleotiden.



**Abbildung 8: Konstruktion eines *Scsip4*-Deletionsstammes in *S. cerevisiae*.**

Schematische Darstellung des *gene replacements* von *ScSIP4* durch *SpHIS5*. Als lineares Transformationsfragment diente das PCR-Produkt von *ScSIP4-KO\_F* und *ScSIP4-KO\_R* an *YDpSpHIS5*, das Primer-vermittelt 50 bp-lange homologe Bereiche zum *ScSIP4*-Lokus aufweist (schwarze Balken).

### 2.1.3. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Während dieser Arbeit konstruierte Plasmide wurden im Anhang in Tabelle A1 aufgelistet.

**Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	Bezeichnung	Herkunft
KEp6	<i>multicopy E.coli/K. lactis</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>Tet<sup>R</sup></i> S11-Fragment aus pKD1 <i>ScURA3</i>	Bianchi <i>et al.</i> , 1987
KEp6KHT3-GUS	KEp6-Derivat mit Insertion eines <i>KHT3-GUS</i> -Konstrukts	K. Breunig
pBSKG4- <i>ScURA3</i>	<i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>ScURA3</i> flankiert vom 3'- und 5'-Bereich von <i>KIGAL4</i> (-1930 bis -41; 2884 bis 4835)	R. Langhammer
pJET1.2	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor; <i>Amp<sup>R</sup></i> , pMB1-Origin (linearisiert mit <i>EcoRV</i> )	Thermo Scientific
pKATUC4	<i>singlecopy E.coli/K. lactis</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>ARS1 KARS12 KICEN2 ScURA3 ScTRP1</i>	Zenke <i>et al.</i> , 1993
pTS32X	<i>multicopy E.coli/K. lactis</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>ScURA3 A B C</i> ( <i>open reading frames</i> von pKD1)	Bui <i>et al.</i> , 1996
pYM2	<i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori ( <i>HA</i> ) <sub>3</sub> <i>HIS3MX6</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
YCplac33	<i>singlecopy E.coli/S. cerevisiae</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>ARS1 ScCEN4 ScLEU2</i>	Gietz und Sugino (1988)
YDpSpHIS5	pUC9-Derivat; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>P<sub>TEF</sub> S. pombe HIS5 T<sub>TEF</sub></i>	Jablonowski (2001)
YEplac112	<i>multicopy E.coli/S. cerevisiae</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>lacZ ScTRP1 2μ ori</i>	Gietz und Sugino (1988)
YEplac195	<i>multicopy E.coli/S. cerevisiae</i> Plasmid; <i>Amp<sup>R</sup></i> pMB1ori <i>lacZ ScURA3 2μ ori</i>	Gietz und Sugino (1988)
YEplac195:: <i>KIHAP4</i>	YEplac195-Derivat; enthält <i>KIHAP4</i> -Lokus (-852 bis 2614)	C. Kleindienst

#### 2.1.4. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle A2 bis Tabelle A7 aufgelistet.

#### 2.1.5. Antikörper

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper**

Zielepitop	Spezies	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>		
HA	Maus (monoklonal)	Santa Cruz (sc-7392)
GST (B-14)	Maus (monoklonal)	Santa Cruz (sc-138)
Nop1 (28F2)	Maus (monoklonal)	Santa Cruz (sc-57940)
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Streptavidin, FITC-konjugiert	-	Zymed (43-4311)
Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert	Ziege	life technologies (GS21040)

#### 2.1.6. Zentrifugen

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

#### 2.1.7. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme)

Die für diese Arbeit verbrauchten Chemikalien und Enzyme sind im Anhang in Tabelle A8 aufgelistet.

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Transformation von Mikroorganismen

##### 2.2.1.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden 2-3 ml  $\phi$ B-Medium (2% [w/v] Trypton; 0,5% [w/v] Hefeextrakt; 10 mM KCl; 16 mM MgSO<sub>4</sub>) mit einer Einzelkolonie beimpft, über Nacht bei 37°C schüttelnd bebrütet, 100 ml frisches  $\phi$ B-Medium mit einer OD<sub>600</sub>-Einheit der Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-5 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend im Eisbad abgekühlt, abzentrifugiert (5 min, 4.000

rpm, 4°C), in 30 ml eiskaltem TFBI (30 mM KAc; 100 mM RbCl; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 15% Glycerol [v/v]; pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 4.000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 4 ml TFBII (10 mM MOPS, pH 7,0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl; 15% Glycerol [v/v]; pH 6,5 mit KOH) aufgenommen und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden je 150 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für die Transformation der chemisch kompetenten Zellen wurden maximal 30 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes zu den noch gefrorenen Zellen gegeben. Es folgten Inkubationen für 20 min auf Eis, für 1 min bei 42°C und für weitere 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen für 15 bis 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### **2.2.1.2. Transformation von Hefen**

#### Herstellung und Transformation nach Agatep *et al.*

Die Transformation von *K. lactis* mit einer *multicopy*-Genbank erfolgte mit frischen chemisch kompetenten Zellen. Zur Herstellung frischer chemisch kompetenter Hefen nach dem Protokoll von Agatep *et al.* (1998) wurden 5 ml YEPD mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C schüttelnd bebrütet. Mit dieser Übernachtskultur wurden 50 ml YEPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3-4 angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,8-1,0) bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde pelletiert (5 min, 4.000 rpm), mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen, in 700 µl 100mM LiAc aufgenommen (Endvolumen 1 ml) und für 10 min bei 30°C inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Zellsuspension für 3 min bei 4.000 rpm pelletiert und in 360 µl Transformationsmix (240 µl 50% [w/v] PEG4000; 26µl 1 M LiAc; 10 µl RNA (10 mg/ml; siehe 2.2.3.1); 1 µg Plasmid-DNA; ad 360 µl H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde für 30 min bei 30°C und für 30 min bei 42°C inkubiert, zentrifugiert (3 min, 4.000 rpm), in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium plattiert.

#### Herstellung und Transformation nach Akada *et al.*

Die Transformation von Plasmid-DNA oder linearen DNA-Fragmenten erfolgte mit gefrorenen kompetenten Zellen. Zur Herstellung gefrorener chemisch kompetenter Hefezellen nach Akada *et al.* (2000) wurden 2 ml YEPD mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C schüttelnd bebrütet. 50 ml YEPD wurden mit 1 ml dieser

Übernachtskultur angeimpft, bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,4 (*K. lactis*) bzw. 0,8 (*S. cerevisiae*) kultiviert und für 3 min bei 4.000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in 2 ml PLAG-Solution (40% [w/v] PEG4000; 0,1 M LiAc; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 15% [v/v] Glycerol) und 250  $\mu$ l RNA (10 mg/ml; siehe 2.2.3.1) resuspendiert, à 150  $\mu$ l in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C langsam eingefroren. Für die Transformation der Hefezellen wurden 100-500 ng Plasmid-DNA bzw. 4-10  $\mu$ g linearer DNA zu den noch gefrorenen Zellen gegeben. Der Transformationsansatz wurde dann mind. 1 h bei 37°C und anschließend für 30 min bei 42°C inkubiert und auf Selektionsmedium plattiert.

### **2.2.2. Präparation von DNA und DNA-basierte Methoden**

#### **2.2.2.1. Isolation plastidärer DNA aus *E. coli***

*E.coli*-Zellen, die ein zu isolierende Plasmid tragen, wurden über Nacht in 5 ml selektivem Medium angezogen. Die Isolierung des Plasmids erfolgte mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

#### **2.2.2.2. Isolation plastidärer DNA aus Hefe**

Hefe-Zellen, die ein zu isolierendes Plasmid tragen, wurde in 5 ml selektivem Minimalmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6-8$ ) angezogen, pelletiert (3 min, 4.000 rpm), in 200  $\mu$ l YML-Puffer (0,9 M Sorbitol; 0,1 M EDTA; 50 mM DTT; 125  $\mu$ g/ml Zymolyase 100T) resuspendiert und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Die daraus entstandenen Spheroplasten wurden pelletiert (5 min, 1.000 x g) und in 250  $\mu$ l Resuspensions-Puffer (*GeneJET Plasmid Mini Kit*; Thermo Scientific) aufgenommen. Die weitere Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Kits und nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 10  $\mu$ l steriles Wasser eluiert und in kompetente *E. coli* transformiert.

#### **2.2.2.3. Isolation chromosomaler DNA aus Hefe**

Die Isolation chromosomaler DNA aus Hefe erfolgte nach der Methode von Hoffman und Winston (1987). 5 ml YEPD wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Für den Zellaufschluss wurde die Kultur pelletiert (3 min, 4.000 rpm), in 200  $\mu$ l *Breaking*-Puffer (2% [v/v] Triton X-100; 1% [w/v] SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und mit 200  $\mu$ l *Glass beads* (0,4-0,6  $\mu$ m) und 200  $\mu$ l PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) versetzt und für 4 min stark



gevoertext. Nach Zugabe von 400 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm), die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 96% EtOH versetzt und erneut zentrifugiert (3 min, 14.000 rpm). Das Pellet wurde vorsichtig in 200µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 resuspendiert, mit 7 µl RNaseA (1 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 20 µl NH<sub>4</sub>Ac und 500 µl 96% EtOH vermischt, zentrifugiert (3 min, 14.000 rpm) und das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde abschließend in 50-100 µl sterilem Wasser aufgenommen.

#### 2.2.2.4. Schnellisolation von Gesamt-DNA aus Hefe für Kolonie-PCR

Die Schnellisolation von Gesamt-DNA aus Hefe erfolgte nach der Methode von Lööke *et al.* (2011). Dafür wurde eine Einzelkolonie oder 100-200 µl pelletierte Zellen aus einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 in 100 µl 200 mM LiAc und 1% [w/v] SDS gelöst und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 96% EtOH wurden DNA und Zelltrümmer pelletiert (3 min, 14.000 rpm) und mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen. Nach Pelletierung der Zelltrümmer (15 sec, 14.000 rpm) wurde 1 µl des Überstands für PCR eingesetzt.

#### 2.2.2.5. Modifizierung und Analyse von DNA

##### 2.2.2.5.1. Amplifizierung von DNA-Sequenzen

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen erfolgte mit *Phusion* Polymerase (Thermo Scientific) bzw. für Nachweis-PCR-Analysen mit einer *Hot Start Taq* Polymerase (FastStart PCR Master, Roche). Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten > 5 kb wurde eine *Hot Start OptiTaq* Polymerase (NEB) verwendet. Verwendete dNTPs wurden von Thermo Scientific bezogen. Wurden direkt Hefe-Zellen als *template* für die PCR-Reaktion verwendet, verlängern sich die Denaturierungsschritte (initiale Denaturierung 10', jede weitere Denaturierung je 1') und erhöht sich die Zyklenzahl auf 40.

**Tabelle 6: Reaktionsansatz und PCR-Programm für *Phusion*, *Taq* und *OptiTaq* Polymerase**

PCR-Ansatz	PCR-Programm
<b>PCR mit <i>Phusion</i> Polymerase</b>	
- 10 µl 2 x Phusion Master-Mix	98°C-30'';
- 2 µl je Primer (2 µM)	[98°C-10''; T <sub>A</sub> °C-20''; 72°C-30''/kb] x 35 Zyklen
- 5-20 ng DNA	72°C-5'

---

**PCR mit *Hot Start Taq* Polymerase**

---

- 10 µl 2 x Taq Master-Mix	95°C-2';
- 2 µl je Primer (2 µM)	[95°C-30"; T <sub>A</sub> °C-30"; 72°C-1'/kb] x 35 Zyklen
- 5-20 ng DNA	72°C-5'

---

**PCR mit *Hot Start OptiTaq* Polymerase**

---

- 2 µl 10 x Pol Buffer B	
- 2 µl je Primer (2 µM)	94°C-2';
- 2 µl dNTP-Mix (je 2 mM)	[94°C-15"; T <sub>A</sub> °C-30"; 68°C-1'/kb] x 35 Zyklen
- 0,5 U <i>OptiTaq</i>	72°C-7'
- ad 20 µl H <sub>2</sub> O	

---

**2.2.2.5.2. Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Analyse von DNA wurde diese auf 0,8%-ige bzw. 2%-ige [w/v] Agarosegele in 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung im UV-Licht wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25 µg/ml) zu den Agarosegelen hinzugegeben oder ein Ethidiumbromid-Ersatzstoff (EZ-Vision, 1 µl 6 x Puffer pro 20 µl Ansatz; Amresco) mit der DNA vermischt. Den DNA-Proben wurde zudem 1/5 Volumen 5 x DNA-Ladepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 50% [v/v] Glycerol; 0,1% [w/v] Orange G) zugegeben. Als Größenstandard diente ein *GeneRuler DNA Ladder Mix* (SM0331, Thermo Scientific).

**2.2.2.5.3. DNA-Elution aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (ZymoResearch) nach Herstellerangaben verwendet.

**2.2.2.5.4. Restriktion von DNA**

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Enzymen von Thermo Scientific in den vom Hersteller empfohlenen Puffer und durch Inkubation zur angegebenen optimalen Temperatur.

**2.2.2.5.5. Dephosphorylierung von DNA**

Um Re-Ligation bei Klonierungen zu verhindern, erfolgte die Dephosphorylierung von DNA zeitgleich mit der Restriktion durch Zugabe von 1 µl Fast-AP (1 U/µl, Thermo Scientific) pro 1 µg DNA und Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 70°C.

**2.2.2.5.6. Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte im molaren Verhältnis Vektor:Insert = 1:3 bis 1:5 unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (5 U/µl; Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.5.7. Blunting von DNA-Überhängen**

Das Auffüllen von 5'-Überhängen oder Entfernen von 3'-Überhängen wurde mit Hilfe des *Klenow* Fragments (10 U/μl; Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.2.5.8. Digoxigenin-Markierung von DNA**

Die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für *Southern* und *Northern* Analysen erfolgte über PCR in folgendem Ansatz: 5 μl 10 x *Taq*-Puffer (mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ohne MgCl<sub>2</sub>, Thermo Scientific); 5 μl je Primer (2 μM); 2,5 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 10 ng DNA; 2,5 μl DIG-dNTPs (*DIG labeling Mix*, Roche); 5 U *Taq*-Polymerase (5 U/μl, Thermo Scientific); ad 50 μl H<sub>2</sub>O. Zur Amplifizierung der DIG-markierten DNA wurde folgendes Programm genutzt: 95°C-2'; [95°C-30"; T<sub>A</sub>-30"; 72°C-2'/kb] x 35; 72°C-10'. Zum Entfernen nicht eingebauter DIG-dNTPs wurde das DIG-markierte PCR-Produkt aufgereinigt.

#### **2.2.2.5.9. Herstellung einer DIG-markierten DNA-Leiter**

Die Herstellung einer DIG-markierten Leiter erfolgte mit Hilfe des *Klenow* Fragments. 6 μg Leiter-DNA, 4 μl 10 x Hexanukleotidmix (Roche), 4 μl *DIG-Labeling Mix* (Roche), 4 μl 10 x *Klenow*-Puffer, 2 μl *Klenow* Fragment (10 U/μl; Thermo Scientific) und 28 μl H<sub>2</sub>O wurden vermischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 1 Vol. PEG-Lösung (26,3% [w/v] PEG8000; 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6 M NaAc pH 5,2) versetzt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (20 min, 13.000 rpm). Nach Waschen des Pellets mit 500 μl 70% EtOH wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100 μl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.2.5.10. Reinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific) laut Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.5.11. Fällung von DNA**

Zur Fällung von DNA wurde dem Ansatz 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5,3 und 3 Vol. 96% EtOH zugegeben, durch invertieren gemischt und zentrifugiert (20 min, 14.000 rpm, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 500 μl 70% EtOH gewaschen und das luftgetrocknete Pellet im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

#### **2.2.2.5.12. Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoPhotometer (Implen) oder NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) durch auftropfen von 1 - 3 μl DNA-Lösung auf den Messsensor bestimmt.

#### **2.2.2.5.13. Ortsgerichtete Mutagenese**

Ortsgerichtete Mutagenesen wurden Primer-vermittelt mit Hilfe des *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.2.5.14. InFusion-Klonierung**

InFusion-Klonierungen wurden unter Verwendung des *In-Fusion HD Cloning Kits* (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.2.5.15. Sequenzierung**

Zur Sequenzierung von DNA wurde der *Big Dye Terminator Cycle* Sequenzierkit (PE Biosystems) genutzt. Für die Sequenzierreaktion wurden 2 µl 5 x Big Dye-Puffer, 1 µl Terminator-Mix, 2 µl Primer (5 µM) und DNA nach Herstellerangaben sowie ad 10 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Die Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab: 95°C-2'; [95°C-30"; T<sub>A</sub>-30"; 60°C-4'] x 40. T<sub>A</sub> ist die spezifische *Annealing*-Temperatur. Das Reaktionsvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Die Fällung erfolgte wie unter 2.2.2.5.11 beschrieben, wobei die Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur ausgeführt wurden. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und zur weiteren Analyse an den hauseigenen Sequenzier-Service gegeben.

#### **2.2.2.5.16. Southern Blot-Analyse**

4 - 10 µg isolierter chromosomaler DNA (siehe 2.2.2.3) wurden über Nacht in einem 100 µl-Ansatz mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde gefällt, in 20 µl 1 x DNA-Ladepuffer aufgenommen und auf einem 0,8%-igen Agarosegel für 2,5 h bei 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 250 ng *GeneRuler DNA Ladder Mix* mit auf das Gel geladen. Zur Vorbereitung für den *Blot* wurde das Gel für zweimal 15 min in Blot-Lösung I (0,25 M HCl), für zweimal 15 min in Blot-Lösung II (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und für zweimal 30 min in Blot-Lösung III (1 M NH<sub>4</sub>Ac) inkubiert. Vor jedem Pufferwechsel wurde das Gel für 5 min mit Wasser gewaschen. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (NJ1370, Roche) erfolgte über Nacht durch Kapillarblotverfahren. Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet und bei 120 mJ/cm<sup>2</sup> im Transilluminator (UV Crosslinker CI-1000; UVP) durch UV-Licht auf der Membran fixiert.

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 8 Stunden in Hybridisierungspuffer (5 x SSC; 1% [w/v] Blocking Reagenz (Roche); 0,1% [w/v] N-Laurylsarkosin; 0,2% [w/v] SDS; 20 ml/100cm<sup>2</sup>) bei 68°C im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Membran mit 10 ml Hybridisierungspuffer versetzt, der die DIG-markierter Sonde und die DIG-markierter DNA-

Leiter enthielt und für 5 min aufgekocht wurde, und über Nacht bei 68°C inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer I (2 X SSC; 0,1% [w/v] SDS) für je 5 min bei Raumtemperatur und zweimal mit Waschpuffer II (0,5 x SSC; 0,1% [w/v] SDS) für je 15 min bei 68°C gewaschen (ca. 50 ml/100 cm<sup>2</sup>).

Zum immunologischen Nachweis der DIG-markierten DNA wurde die Membran für 2 min in P1-Puffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) gewaschen, für 30 min in 30 ml P2-Puffer (1% [w/v] Blocking Reagenz in P1-Puffer) und für 30 min in 10 ml Antikörper-Lösung (Anti-DIG-AP-Konjugat, 1:5.000 in P2-Puffer (Roche)) inkubiert. Nach zweimaligen Waschen für 15 min in P1-Puffer + 0,3% Tween 20 wurde die Membran für 3 min in P3-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 10 mM NaCl) äquilibriert, mit CSPD-Lösung (15 µl CSPD (Roche) in 885 µl P3-Puffer) benetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Röntgenfilm (CEA, Deutschland).

### **2.2.3. Präparation von RNA und RNA-basierte Methoden**

#### **2.2.3.1. RNA-Isolation aus *E. coli***

Die zur Transformation von Hefen eingesetzte RNA wurde aus *E. coli* gewonnen. Dafür wurden 2 ml SOB-Medium (0,5% [w/v] Hefeextrakt; 2% [w/v] Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>) mit einer Einzelkolonie Top10-Zellen beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 250 ml Hauptkultur wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur beimpft und erneut über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde dann pelletiert (5 min, 6.000 rpm) und das Pellet gründlich in 10 ml P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer (0,2 M NaOH; 1% [w/v] SDS) und 10 ml P3-Puffer (2,55 M KaAc, pH 4,8) (nach jedem Puffer mischen durch invertieren) wurde die Suspension zentrifugiert (45 min, 10.000 rpm). Der Überstand wurde auf einen Faltenfilter gegeben und der Durchfluss mit 1 Vol. Isopropanol versetzte. Nach 3 - 5 maligem Invertieren wurde die Probe zentrifugiert (60 min, 10.000 rpm). Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 2 ml 70% EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 1 - 2 ml RNase-freiem Wasser aufgenommen. Nach Konzentrationsbestimmung wurde diese auf 10 mg/ml eingestellt, à 250 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.2. RNA-Isolation aus Hefe

Zur Isolierung von RNA aus Hefe wurde das *Universal RNA Isolation Kit* (Roboklon) verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren, bis auf folgende Abänderungen. Für die Isolation wurden 20 ml einer Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,6-8 genutzt. Der YL-Puffer wurde mit DEPC (1 ml/L) behandelt. Nach Lyse der Spheroblasten in RL-Puffer wurde der Ansatz für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgte mit 90% EtOH. Nach einem ersten Waschschrift mit DN1-Puffer erfolgte ein DNaseI-Verdau auf der Säule mit 1 U DnaseI (Ambion) (siehe Anleitung, Appendix Seite 16).

### 2.2.3.3. Analyse von Transkriptlevel mittels quantitativer RT-PCR

Die Analyse verschiedener Genexpressionslevel erfolgte auf Transkriptebene mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR). Dafür wurde die isolierte RNA auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l eingestellt. 400 ng RNA wurden unter Verwendung des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Scientific) in folgendem Ansatz in cDNA umgeschrieben: 4  $\mu$ l 5 x Reaktionspuffer; 1  $\mu$ l oligo (dT)<sub>18</sub> Primer; 0,5  $\mu$ l RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l; Thermo Scientific); 2  $\mu$ l 10 mM dNTPs; 1  $\mu$ l RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l; Thermo Scientific); 7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Zunächst wurden RNA und Wasser vermischt und denaturiert (10 min, 65°C), danach wurden die übrigen Komponenten als Mastermix hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert und für 5 min bei 70°C inaktiviert. Für die qRT-PCR-Analyse wurde die cDNA 1 : 4 in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> verdünnt, die PCRs erfolgten in einem *iCycler IQ5 Real-Time PCR Detection System* (BioRad) unter Verwendung von 2x iQ SYBR GreenSupermix (BioRad) und genspezifischen Primern (siehe Tabelle A5). Für die Amplifizierung wurde folgendes PCR-Programm angewandt: 95°C-10'; [95°C-15"; 55°C-15"; 72°C-30"] x 50 Zyklen. Um sicherzugehen, dass für das jeweilige Gen nur ein spezifisches PCR-Produkt entsteht, wurden zudem Schmelzkurven-Analysen mit folgendem Programm durchgeführt: von 55°C bis 95°C in 81 Schritten mit einem Intervall von 0,5°C für jeweils 10 sec pro Intervall. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mittels BioRad iCycler iQ5 Software V2.1, der *Threshold* wurde manuell auf 500 gesetzt. Zur Kontrolle wurde für jede Analyse eine cDNA-Reaktion ohne Zugabe von Reverser Transkriptase und für jede PCR eine Reaktion ohne DNA angesetzt. Als Referenz-gene wurden für *S. cerevisiae* *SCEM2* und für *K. lactis* *KIIPP1*, *KIHEM2* oder *KIALG9* (Teste et al., 2009) verwendet, um Transkriptlevel zu normalisieren. LinRegPCR V12.18 Software wurde genutzt, um die spezifische Amplifizierungseffizienz eines jeden Primerpaares zu kalkulieren. Die Berechnung relativer

Transkriptlevel zwischen Wildtyp und Mutante oder zwischen zwei verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose versus alternative C-Quelle) erfolgte über die relative Quantifizierungsmethode unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz nach Pfaffl (2004) (Gleichung 1):

$$\text{relative Expression (R)} = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta\text{Ct}(\text{Wildtyp} - \text{Mutante})}}{E(\text{Referenzgen})^{\Delta\text{Ct}(\text{Wildtyp} - \text{Mutante})}} \quad (1)$$

Alle Ergebnisse stellen den Mittelwert von drei unabhängigen biologischen Replikaten, gemessen in drei technischen Replikaten dar.

### **2.2.3.4. Northern Blot-Analyse**

5 µg RNA wurden mit 1 Vol. RNA-Probenpuffer (6,85% [v/v] Formamid; 25% Formaldehyd [v/v]; 4% [w/v] Ficoll 4000; 0,625 ng/ml Ethidiumbromid; 1 Spatelspitze Bromphenolblau in 1 x MOPS-Puffer (40 mM MOPS; 100 mM NaAc; 10 mM EDTA; pH 7,2)) versetzt, für 10 min bei 65°C inkubiert und auf einem 1%-igen Formaldehyd-Gel (1% [w/v] Agarose; 2% [v/v] Formaldehyd; 1 x MOPS-Puffer) elektrophoretisch für 3 h bei 100 V in 1 x MOPS-Puffer aufgetrennt. Nach Spülen des Formaldehydgels mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> erfolgte der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (NJ1370, Roche) via Kapillarblotverfahren über Nacht in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat; pH 7,3). Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet und bei 120 mJ/cm<sup>2</sup> im Transilluminator (UV Crosslinker CI-1000; UVP) durch UV-Licht auf der Membran fixiert.

Die für Hybridisierung und immunologischen Nachweis verwendeten Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> hergestellt. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 8 Stunden in High-SDS-Puffer (5 x SSC; 1% [w/v] Blocking Reagenz (Roche); 0,1% [w/v] N-Laurylsarkosin; 7% [w/v] SDS; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0; 50% deionisiertes Formamid; 20 ml/100cm<sup>2</sup>) bei Verwendung einer DNA-Sonde bei 50°C im Hybridisierungsöfen. Anschließend wurde die Membran mit 10 ml High-SDS-Puffer versetzt, der die DIG-markierter Sonde enthielt und für 5 min aufgekocht wurde, und über Nacht bei 50°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Membran erfolgt analog zum *Southern Blot* (2.2.2.5.16).

### **2.2.3.5. Genomweite Untersuchung der Genexpression (Microarray-Analyse)**

Transkriptomweite Analysen zur Genexpression erfolgten mit GeneChip Microarrays von Affymetrix (GeneChip® DSM\_Kalaca520378FC). Die Annotierung erfolgte von Affymetrix mit

Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) bzw. Entrez ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLA\\_Course/Original8Hour/Entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLA_Course/Original8Hour/Entrez)) und Pedant2 (<http://pedant.gsf.de/>). Die reverse Transkription der RNAs sowie die Hybridisierung der *Microarrays* wurde von Dr. Vesselin Christov im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der MLU Halle durchgeführt. Die Rohdaten der *Microarrays* befinden sich auf der beigefügten CD (siehe Tabelle A12). Die bioinformatische Aufbereitung der Daten erfolgte durch Dipl.-Bioinform. Ioana Lemnian am Institut für Informatik (AG Prof. Dr. I. Große) der MLU Halle unter Verwendung des R-Statistik-Programms. Dafür wurden die Bioconductor-Pakete „*affy*“, „*simpleaffy*“ und „*multtest*“ benutzt ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Die rohen Expressionsdaten wurden über RMA (*robust multi-array average*) normalisiert. Dafür wurden die Werte nach einer Hintergrundkorrektur zur Basis 2 logarithmiert. Anschließend erfolgte eine Quantil-Normalisierung über alle *Microarrays*. Durch die Anwendung eines linearen Modells auf die normalisierten Werte konnten aus den gemessenen Intensitäten die Expressionswerte der Proben berechnet werden. Der  $\log_2$ -fold change berechnet sich als Differenz der arithmetischen Mittel der logarithmierten Expressionswerte der Proben unter den jeweiligen Bedingungen (Gleichung 2):

$$\log_2FC = \frac{\log_2e_{A1} + \log_2e_{A2} + \log_2e_{A3}}{3} - \frac{\log_2e_{B1} + \log_2e_{B2} + \log_2e_{B3}}{3} \quad (2)$$

e = Expressionswert

A, B = Bedingung A und B (Glukose vs. Glycerol/Ethanol bzw. *Kladr1Δ* vs. WT)

1, 2, 3 = biologische Replikate

Die Berechnung der Signifikanz (p-Wert) der relativen Expressionslevel erfolgte im Vergleich der Wildtypen in verschiedenen Kohlenstoffquellen (Kapitel 3.1) mittels t-Test und Korrektur über Benjamini-Hochberg-Methode (korrigierter p-Wert). Im Vergleich Mutante gegen Wildtyp (Kapitel 3.2.7) erfolgten die Berechnung der p-Werte über shrinkage t-Test (Opgenrein und Strimmer, 2007) und die Korrektur der p-Werte mit Hilfe der R-Pakete „*st*“ und „*fdrtool*“. Als statistisch signifikant verschieden gilt ein korrigierter p-Wert  $\leq 0,05$ . Als differentiell exprimiert gilt ein Gen, dessen relative Expression im Vergleich zur Kontrolle 2-fach hoch- oder herunter reguliert ist. Die auf dem Array enthaltenen *K. lactis*-Lokusnamen wurden auf Aktualität überprüft und gegebenenfalls mit der neuen Bezeichnung verknüpft (Tabelle A9 und Tabelle A10). Daten von nicht annotierten Genen wurden nicht weiter berücksichtigt, sodass 4937 Gene für die Auswertung bereit standen. Die Eingruppierung



differenziell exprimierter Gene in funktionelle Kategorien erfolgte über die MIPS-Kategorisierung der FunCat-Datenbank ([mips.helmholtz-muenchen.de/funecatDB](http://mips.helmholtz-muenchen.de/funecatDB)).

## **2.2.4. Präparation von Proteinen und Protein-basierte Methoden**

### **2.2.4.1. Isolation von Gesamt-Rohextrakt aus Hefe**

50 ml einer Hefekultur in logarithmischer Wachstumsphase ( $OD_{600}=0,6-8$ ) wurde pelletiert (3 min, 4.000 rpm) und mit 20 ml kaltem Wasser gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das Zellpellet wurde in 400 µl B60-Puffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,3; 60 mM KAc; 5 mM MgAc; 10% [v/v] Glycerol; 0,1% Triton X100; 1 mM NaF; 20 mM Glycerophosphat; 1mM DTT; Complete Protease-Inhibitor (Roche)) resuspendiert und mit 300 µl Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch sehr starkes Vortexen (Multi Pulse Vortexer Glas-Col) für dreimal 4 min, dazwischen jeweils 4 min Pause. Nach Zweimaligen Zentrifugieren (erst 5 min, dann 20 min bei 10.000 rpm) wurde die Konzentration des Rohextrakts (Überstand) bestimmt, das gewünschte Volumen an Rohextrakt mit 6 x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25% [v/v] Glycerol; 0,25 mg/ml Bromphenolblau; 12,5% 2-Mercaptoethanol; 7,5% [w/v] SDS) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert.

### **2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration eines Rohextrakts wurde mit Hilfe eines Bradford-Tests (BioRad Protein Assay) in einer 1 ml Küvette nach Angaben des Herstellers ermittelt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min inkubiert, die Absorption bei 595 nm gemessen (Beckman Coulter DU 640) und die Konzentration anhand einer Standarddeichkurve mit BSA bestimmt.

### **2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) unter Verwendung einer Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Verhältnis 37,5 / 1). In 6-12%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Sammelgel: 5% Acrylamid; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% [w/v] SDS; Trenngel: 6-12% Acrylamid; 125 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% [w/v] SDS)) wurden die Proteine für 1 bis 1,5 h bei 200 V in 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% [w/v] SDS) aufgetrennt.

#### **2.2.4.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen (*Western Blot-Analyse*)**

Zum immunologischen Nachweis Epitop-markierter Proteine wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose- (Hybond-ECL, GE Healthcare) oder PVDF-Membran (Millipore Immobilon P-Membran; 0,45 µm Porengröße) übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Nass-Blot-Verfahren für 1 bis 1,5 h bei 100 V bei 4°C in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% [v/v] Methanol). Die Membran wurde anschließend für 1 h in TBSTM (20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,3% [v/v] Tween 20; M: 5% [w/v] Milchpulver) blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem primären Antikörper (1:4000 in TBSTM) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 15 min wurde die Membran für 1 h mit einem sekundärem Antikörper (1:10.000 in TBSTM) inkubiert und erneut für dreimal 15 min in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer ECL Plus bzw. Prime Western Blotting Detektionsreagenz (Amersham) und Röntgenfilmen (CEA, Deutschland).

#### **2.2.4.5. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

Das Anfärben von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte über Coomassie-Färbung. Die Gele wurden dafür nach erfolgter SDS-PAGE mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> gespült, für 40 bis 60 sec in Coomassie-Färbelösung (0,1% [w/v] Coomassie R250; 10% [v/v] Essigsäure; 40% [v/v] Methanol) in der Mikrowelle (Moulinex Optimo) bei 900 W erhitzt und für 1 h inkubiert. Die Coomassie-Färbelösung wurde abgekippt, das Gel mehrmals mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> gespült und mit Coomassie-Entfärbelösung (10% [v/v] Essigsäure; 20% [v/v] MeOH) versetzt. Das Entfärben der Gele erfolgte nach erneutem Erhitzen in der Mikrowelle für 40 bis 60 sec bei 900 W und Inkubation für mindestens 1 h.

#### **2.2.4.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten**

##### **2.2.4.6.1. β-Glucuronidase-Aktivität**

50 ml einer Hefekultur in logarithmischer Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> von 0,6-8) wurde pelletiert (3 min, 4.000 rpm), in 20 ml kalten GUS-Puffer (10 mM NaP-Puffer, pH 7,0; 10 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,1% [v/v] N-Laurylsarkosin; 0,1% [v/v] Triton X-100) gewaschen und in 500 µl GUS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl *glass beads* erfolgte der Zellaufschluss für dreimal 4 min durch sehr starkes Vortexen (Multi Pulse Vortexer Glas-Col) bei 4°C mit jeweils 4 min Pause. Nach zweimaligem Zentrifugieren (erst 5 min, dann 20 min, 10.000 rpm, 4°C) konnte der Überstand (= Rohextrakt) für die Messung der β-Glucuronidase-

Aktivität eingesetzt werden. Dafür wurde 1 ml einer auf 37°C vorgewärmten PNPG-Lösung (1 mM PNPG in GUS-Puffer) in einer Küvette (d = 1 cm) vorgelegt und mit maximal 100 µl Rohextrakt versetzt. Gemessen wurde die β-Glucuronidase-vermittelte Freisetzung von PNP ( $\epsilon = 8.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) aus PNPG bei einer Wellenlänge von 415 nm über 3 min bei 37°C in einem Spektrophotometer (Beckman Coulter DU 640). Die Berechnung der β-Glucuronidase-Aktivität erfolgte über folgende Gleichung (3):

$$\text{Aktivität} \left[ \frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right] = \frac{\Delta A}{d * \epsilon * c * V} * 1000 \quad (3)$$

$\Delta A$  = Veränderung der Absorption pro Minute

d = Schichtdicke der Küvette

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration des Proteinrohextrakts

V = eingesetztes Volumen des Proteinrohextrakts

#### **2.2.4.6.2. β-Galaktosidase-Aktivität**

Die Herstellung des Rohextrakts und Messung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte analog zur Messung der β-Glucuronidase-Aktivität (siehe 2.2.4.6.1) mit folgenden Abweichungen: Für den Zellaufschluss wurde β-Gal-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 7,8; 5% [v/v] Glycerol; 10 mM KCl) verwendet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in auf 30°C vorgewärmter ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in β-Gal-Puffer). Gemessen wurde die β-Galaktosidase-vermittelte Freisetzung von ONP ( $\epsilon = 4.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) aus ONPG bei einer Wellenlänge von 420 nm über 3 min bei 30°C. Die Berechnung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte mit Gleichung 3 (Seite 41).

#### **2.2.4.6.3. Isocitratlyase-Aktivität**

Die Messung der Isocitratlyase-Aktivität erfolgte nach dem Protokoll von Dixon und Kronberg (1959), abgeändert nach Georis und Heinisch (Georis *et al.*, 2000). Der Zellaufschluss erfolgte analog zur Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität (siehe 2.2.4.6.1) in 400 µl 33,8 mM NaP-Puffer, pH 7,0. Der Nachweis der Isocitratlyase-Aktivität erfolgte über die Umsetzung von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat. In Anwesenheit von Phenylhydrazin reagiert Glyoxylat mit Phenylhydrazin zu Glyoxylsäurephenylhydrazon. Für die Messung wurden 20-50 µl des Proteinrohextrakts mit einem auf 30°C vorgewärmten Puffer E (1.000 Vol. 33,8 mM NaP-Puffer, pH 7,0; 1 Vol. 103,1 mM L-Cystein-HCl (frisch hergestellt, Lagerung auf Eis); 30 Vol. 112,6 mM Phenylhydrazin-HCl (frisch hergestellt,

Lagerung auf Eis)) zu einem finalen Volumen von 950 µl versetzt. Nach 2-minütiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 200 mM DL-Isocitrat, pH 6,5 gestartet. Gemessen wurde die Bildung von Glyoxylsäurephenylhydrazon ( $\epsilon = 1.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei einer Wellenlänge von 324 nm über 5 min bei 30°C. Die Berechnung der Isocitratlyase-Aktivität erfolgte mit Gleichung 3 (Seite 41).

#### **2.2.4.6.4. Nachweis der Adh-Aktivität über *in gel*-Färbung**

Die Herstellung von Proteinrohextrakt aus Hefekulturen und die Auftrennung der Proteine auf einem nativen PAA-Gel erfolgten nach Angaben von Dombeck und Young (1997). Die anschließende Visualisierung der ADH-Aktivität erfolgte nach Fowler *et al.*, 1972. 30 ml einer Hefekultur wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{600} = 1$ ) in Minimalmedium mit 2% Glukose (reprimierend) angezogen und für 6 Stunden in Minimalmedium mit 0,05% Glukose (de-reprimierend) überführt. Zu beiden Zeitpunkten wurden 10 ml Kultur pelletiert und in 700 µl *ADH lysis buffer* (85 mM KCl; 30 mM Tris/HCl, pH 7,5; 3 mM MgAc; 25% (w/v) Glycerol) gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 200 µl *ADH lysis buffer* + 0,07% 2-Mercaptoethanol und 200 µl *glass beads* versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte für dreimal zwei Minuten bei 4°C durch sehr starkes Vortexen (Multi Pulse Vortexer Glas-Col) mit jeweils 2-minütigen Pausen. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Zelltrümmer bei 13.000 rpm und 4°C wurden 50 µg Rohextrakt der reprimierten und 25 µg Rohextrakt der de-reprimierten Proben mit 1/5 Volumen 5xLadepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 25% (w/v) Glycerol; 0,05% Bromphenolblau) versetzt. Die Proben wurden auf einem 5%-igen, nativen PAA-Gel in Tris-Glycin-Puffer (1,44% (w/v) Glycin; 0,3% (w/v) Tris) bei 150 V und 4°C aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 5 min in 100 mM Tris/HCl, pH 8,8 bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der ADH-Aktivität erfolgte in *ADH activity buffer* (100 mM Tris/HCl, pH 8,8; 1 mg/ml NAD; 0,2 mg/ml Nitroblautetrazoliumchlorid; 0,08 mg/ml Phenazinmethasulfat; 0,1% (v/v) Ethanol) nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C. Die Dokumentation erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (*Molecular Imager Gel Doc XR+ with Image Lab Software*, Biorad).

#### **2.2.4.7. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Zum *Crosslinken* von DNA und Proteinen wurden 50 ml einer logarithmischen Kultur mit 1,4 ml 37% [v/v] Formaldehyd (final: 1%) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur langsam

schwenkend inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,7 ml 2,5 M Glycin und durch langsam schwenkende Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Kultur wurde pelletiert (5 min, 4.000 rpm), zweimal mit kaltem 1 x TBS (150 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl, pH 7,6) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte in 250 µl Lysis-Puffer (140 mM NaCl; 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1% [v/v] Triton X-100; 0,1% [w/v] Natriumdeoxycholat; Complete Protease-Inhibitor (Roche)) und 1 Vol. *glass beads* für dreimal 5 min durch sehr starkes Vortexen (Multi Pulse Vortexer Glas-Col), zwischendurch wurde der Ansatz jeweils 5 min auf Eis ruhen gelassen. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µl Lysis-Puffer versetzt. Das Scheren der DNA im Zelllysate erfolgte durch Ultraschallbehandlung im Wasserbad bei 4°C (30 s on / 60 s off in 10 (K/Adr1) bzw. 15 (K/Sip4) Zyklen bei 200 W; Bioruptor, Diagenode). Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, 4°C) wurden 50 µl des Überstandes mit 200 µl TES-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,67% [w/v] SDS) versetzt (Input). Die verbliebenen 250 µl des Überstands wurden mit 2,5 µg Antikörper (α-HA, monoklonal, aus Maus, Santa Cruz) versetzt und für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer Protein A-Sepharose-Suspension (100 µl Protein A-Sepharose (PAS) in 1 ml 1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), mind. 1 h bei Raumtemperatur quellen lassen) dem Lysat-Antikörper-Gemisch hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die PAS-AK in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (1 min, 1.000 rpm) und nacheinander für jeweils 5 min mit je 2 ml der folgenden Lösungen gewaschen: zweimal mit Lysis-Puffer, einmal mit Lysis500-Puffer (wie Lysis-Puffer, aber 500 mM NaCl), einmal mit LiCl/Detergenz-Lösung (250 mM LiCl; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5% [w/v] Deoxycholat; 0,5% [v/v] Nonidet P-40) und einmal mit 1 x TE (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA). Zur Elution des Präzipitats wurden die PAS-AK mit 100 µl Elutionspuffer (wie 1 x TE plus 1% [w/v] SDS) gemischt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 65°C inkubiert, kurz anzentrifugiert und der Überstand (1. Eluat) in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die PAS-AK wurden weiterhin mit 150 µl TES-Puffer (wie 1 x TE plus 0,67% [w/v] SDS) vermischt, invertiert, kurz anzentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Eluat vereint. Die Reversion des *Crosslinks* erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag wurden die ChIP-Proben mit 250 µl

Proteinase K-Lösung (0,4 µg/µl Proteinase K in 1 x TE) versetzt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Fällung der CHIP-Proben erfolgte durch Zugabe von 3 µl Glycogen (20 mg/ml), 45 µl 5 M LiCl und 1 ml 96% EtOH über Nacht bei -20°C und für 1 h bei -70°C. Zur Pelletierung der präzipitierten DNA wurde der Ansatz zentrifugiert (20 min, 13.000 rpm, 4°C), mit 1 ml 70% EtOH für 5 min bei 4°C gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 21 µl 1 x TE gelöst.

Parallel zur Behandlung der CHIP-Proben wurden auch die Input-Proben aufgereinigt. Zunächst erfolgte die Reversion des *Crosslinks* über Nacht bei 65°C. Nach Zugabe von 250 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 4 h bei 37°C wurde die DNA des Inputs durch dreimalige PCI-Extraktion (jeweils Zugabe von 1 Vol. PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1), 1 min vortexen, zentrifugieren (10 min, 13.000 rpm), Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen) und einmalige Extraktion mit Chloroform (1 Vol.) von den Proteinen getrennt. Die Fällung der Input-Proben erfolgte analog zur Fällung der CHIP-Proben, jedoch ohne Zugabe von Glycogen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl 1 x TE gelöst, mit 2 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Aufreinigung der Input-DNA über Säulchen des *PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) und Elution in 21 µl 1 x TE. Die Konzentration der CHIP- und Input-Proben wurde an einem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bestimmt.

### **2.2.4.8. *Pulldown* DNA-bindender Proteinen**

Zur Isolierung DNA-bindender Proteine in einem *Pulldown*-Experiment wurden Streptavidin-gekoppelte Magnet Beads (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Thermo Scientific) und das 200bp große, biotinylierte UAS<sub>KIFBP1</sub> als Ziel-DNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte größtenteils nach dem Protokoll von Jutras *et al.* (2013).

#### Herstellung Biotin-markierter Ziel-DNA

Die Herstellung des biotinylierten DNA erfolgte über PCR mit jeweils 5 pmol eines 5'-Biotin-gekoppelten *forward* und eines unmodifizierten *reverse* Primers (XY312 und XY313, siehe Tabelle A7) in einem 200 µl Reaktionsansatz mit Phusion-Polymerase. Zur Entfernung verbliebener Biotin-gekoppelter Primer wurde der Ansatz mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) aufgereinigt und in sterilem Wasser aufgenommen. Die Biotinylierung des PCR-Produkts wurde in einem *band shift* Experiment überprüft. Hierfür wurden 100 ng PCR-Produkt mit 1 µl 1:50-verdünntem FITC-gekoppelten Streptavidin und 15

$\mu\text{l}$  1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte auch einem 2%-igen Agarosegel.

### Kopplung Biotin-markierter DNA an Dynabeads

Zur Kopplung von DNA an 1 mg Dynabeads wurden diese 3-mal mit 500  $\mu\text{l}$  2xB/W-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 M NaCl) gewaschen, in 200  $\mu\text{l}$  2xB/W-Puffer aufgenommen, mit einem Volumen biotinylierter DNA (2  $\mu\text{g}$ ) versetzt und für 45 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Abschließend wurden die gekoppelten Dynabeads 3-mal mit 500  $\mu\text{l}$  1 x TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### Aufreinigung DNA-bindender Proteine

Aus 50 ml Hefe-Kultur in logarithmischer Wachstumsphase wurde der Proteinrohextrakt in BS/THES-Puffer (44,3% THES; 20% BS; THES: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 20% [w/v] Saccharose; 140 mM NaCl; 1 mM PMSF; Complete Proteinase Inhibitor (Roche); 5xBS: 50 mM HEPES; 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 250 mM KCl; 60% [w/v] Glycerol) isoliert (siehe 2.2.4.1). Vor der Aufreinigung DNA-bindender Proteine wurde 1 mg ungekoppelte Dynabeads zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  BS/THES-Puffer gewaschen, mit dem Rohextrakt versetzt und für 1 Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. In diesem Schritt wurden alle Proteine, die unspezifisch an Dynabeads binden, entfernt. Anschließend wurden die gekoppelten Dynabeads 2-mal mit 500  $\mu\text{l}$  BS/THES- und einmal mit 500  $\mu\text{l}$  BS/THES+C (BS/THES; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Salmon Sperm* DNA) gewaschen, mit dem Überstand des Rohextrakts, der mit den ungekoppelten Dynabeads inkubiert wurde, sowie mit 30  $\mu\text{g}$  Kompetitor-DNA (*Salmon Sperm* DNA) versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die ungekoppelten Dynabeads wurden weiterhin als Negativkontrolle mitgeführt und wie die gekoppelten Beads behandelt. Danach wurden die Dynabeads 5-mal mit BS/THES+C und 2-mal mit BS/THES gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in jeweils 20  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5) mit aufsteigender NaCl-Konzentration (100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M) für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5  $\mu\text{l}$  5 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die erste Analyse DNA-bindender Proteine erfolgte auf 12%-igen PAA-Gelen und Coomassie-Färbung. Ausgewählte Proben wurden auf einem 4-

12%-igen Bis/Tris Proteingel (Thermo Scientific) aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt und zu analysierende Banden ausgeschnitten.

### Massenspektrometrische Analyse

Die Identifizierung DNA-bindender Proteine erfolgte im universitätsinternen Massenspektrometrie-Service Unit von Frau Dr. Schierhorn. Die Proteinbanden wurden mit Trypsin verdaut, Peptide extrahiert und mittels Nano-HPLC (nanoACQUITY UPLC system, Waters Co.) in analytischen 100 µm x 100 mm RP-Säulen (1,7 µm BEH 130 C18, Waters Co.) aufgetrennt. Die ESI-QTOF-MS/MS-Analyse erfolgte mit einem SYNAPT® G2 HDMS-Massenspektrometer (Waters Co.) im LC/MS<sup>E</sup> Modus. Die anschließende Korrelation zwischen Vorläufer- und Produkt-Ionen wurde durch Retentions- und *drift time*-Alignments erreicht. Die Zuordnung der identifizierten Peptide zu Proteinen erfolgte mit der ProteinLynx GlobalSERVER™ (PLGS) Plattform unter Nutzung der SwissProt-Datenbank und des *K. lactis* Proteoms (NCBI).

### **2.2.4.9. Expression und Aufreinigung von rekombinanten GST-K/Reb1**

#### Isolierung von Proteinrohextrakt aus *E. coli*

Die Herstellung des *E. coli* Proteinextrakts für EMSA-Analysen erfolgte nach der Methode von Morrow *et al.* (1993). Mit pGEX-6P-1 bzw. pGST-KIREB1 transformierten BL21(DE3) pLysS-Zellen wurden bis zum Erreichen der mittleren Wachstumsphase ( $OD_{600} = 1$ ) in 50 ml LB-Medium angezogen, mit 0,4 mM IPTG induziert und für eine Stunde bei 37°C schüttelnd kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert und in 1/20 Volumen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA resuspendiert. Die Disruption der Zellen erfolgte durch schnelles Einfrieren / Auftauen und anschließendem Ultraschall für 3 x 10 sec mit jeweils 30 sec Pause bei 4°C. Nach Zugabe von 1 mM PMSF zur Suspension wurden die Zelltrümmer für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3 Volumen 4,1 M Ammoniumsulfat-Lösung und 30-minütiger Inkubation auf Eis gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 400 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,0 und 1 mM EDTA aufgenommen.

#### Aufreinigung GST-K/Reb1 über GST-Affinitätssäulen

Die Reinigung von GST bzw. GST-K/Reb1 aus *E. coli*-Proteinextrakt erfolgte mittels Affinitätsaufreinigung unter Verwendung von GST SpinTrap™ Säulen (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Proteine erfolgte in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 10



mM reduziertem Glutathion. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.4.2) wurden die Eluate mit Glycerol (final 10%) versetzt, auf 100 ng/ $\mu$ l eingestellt und aliquotiert. Die Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **2.2.4.10. Nicht-radioaktiver EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)**

#### Herstellung doppelsträngiger biotinylierter Oligonukleotide

Die von der Firma Eurofins gelieferten Oligonukleotide wurde in *Annealing Buffer* (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA) resuspendiert. Das 5'-Ende der *forward* gerichteten Sequenz wurde bereits vom Hersteller mit Biotin markiert. 100 pmol je Oligonukleotid wurden mit *Annealing Buffer* vermischt (gesamt 50  $\mu$ l), für 3 min bei 95°C inkubiert und über 45 min bei Raumtemperatur langsam abgekühlt.

#### EMSA-Analyse

Die Durchführung nicht-radioaktiver EMSAs erfolgte unter Verwendung des *Gelshift Chemiluminescent EMSA Kits* (Active Motif) nach Angaben des Herstellers. Die Bindereaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: 1 x *Binding Buffer*; 2,5% Glycerol; 100 mM KCl; 20 mM EDTA; 0,05% NP-40; 0,03 mg/ml BSA; 70 ng/ $\mu$ l Poly(dI-dC) bzw. *salmon sperm* DNA; 10 fmol biotinylierte DNA und 500 ng aufgereinigtes GST bzw. GST-K/Reb1. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 5%-igen nativen PAA-Gel in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 56 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1 mM EDTA) für 110 bis 140 min bei 100 V. Die DNA wurde anschließend für 30 min bei 100 V in einem *wet Blot* auf eine Nylon-Membran (NJ1370, Roche) übertragen. Die Detektion der biotinylierten DNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

### **2.2.5. Phänotypische Charakterisierung von Hefen**

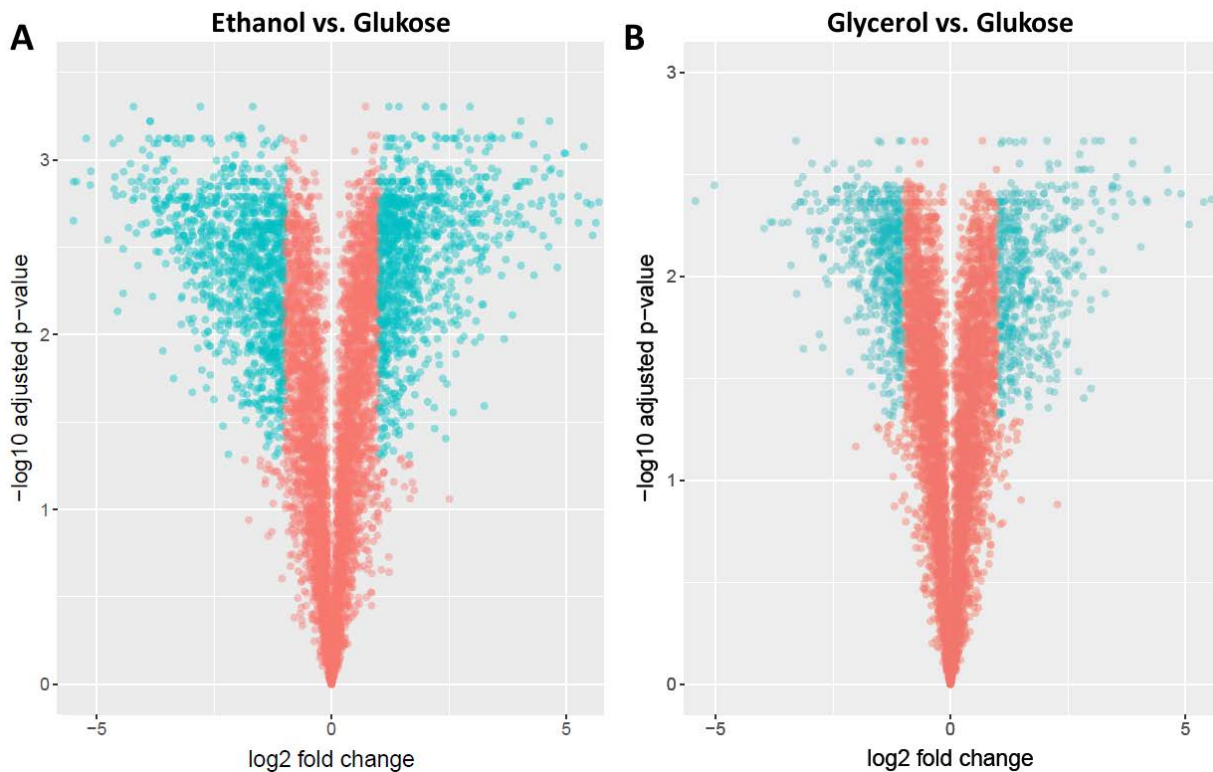
Ausgehend von einer Übernachtskultur wurde eine Verdünnung mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 hergestellt und seriell verdünnt ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ). Jeweils 3  $\mu$ l dieser Verdünnungsstufen wurden auf Minimalmedium getropft und bei 30°C bebrütet. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte nach 2 bis 8 Tagen durch Einscannen der Platten mit einem Geldokumentationssystem (*Molecular Imager Gel Doc XR+ with Image Lab* Software, Biorad) unter Weißlicht oder bei X-Gal-haltigen Platten mit einem Scanner (Epson Perfection V600 Photo).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Analysen zur Verwertung alternativer Kohlenstoffe in *Kluyveromyces lactis*

Die primäre Kohlenstoffquelle von vielen Hefen ist Glukose. Wird Glukose jedoch limitierend, findet in der Zelle eine massive Umprogrammierung des Transkriptoms statt, um auf die veränderten Bedingungen zu reagieren und alternative Kohlenstoffquellen zu erschließen. In *S. cerevisiae* ist dieser Prozess bereits gut untersucht (DeRisi *et al.*, 1997) und auch für *K. lactis* wurden bereits Studien während des diauxischen *Shifts* durchgeführt (Thompson *et al.*, 2013). Doch wie verhält sich *K. lactis* bei plötzlich auftretendem Glukosemangel? Und gibt es Unterschiede dahingehend, ob C2- oder C3-Körper als Kohlenstoffquelle angeboten werden? Da *K. lactis* auf Glycerol ein deutlich besseres Wachstum zeigt als auf Ethanol (persönliche Beobachtung), scheint zumindest letztes wahrscheinlich zu sein.

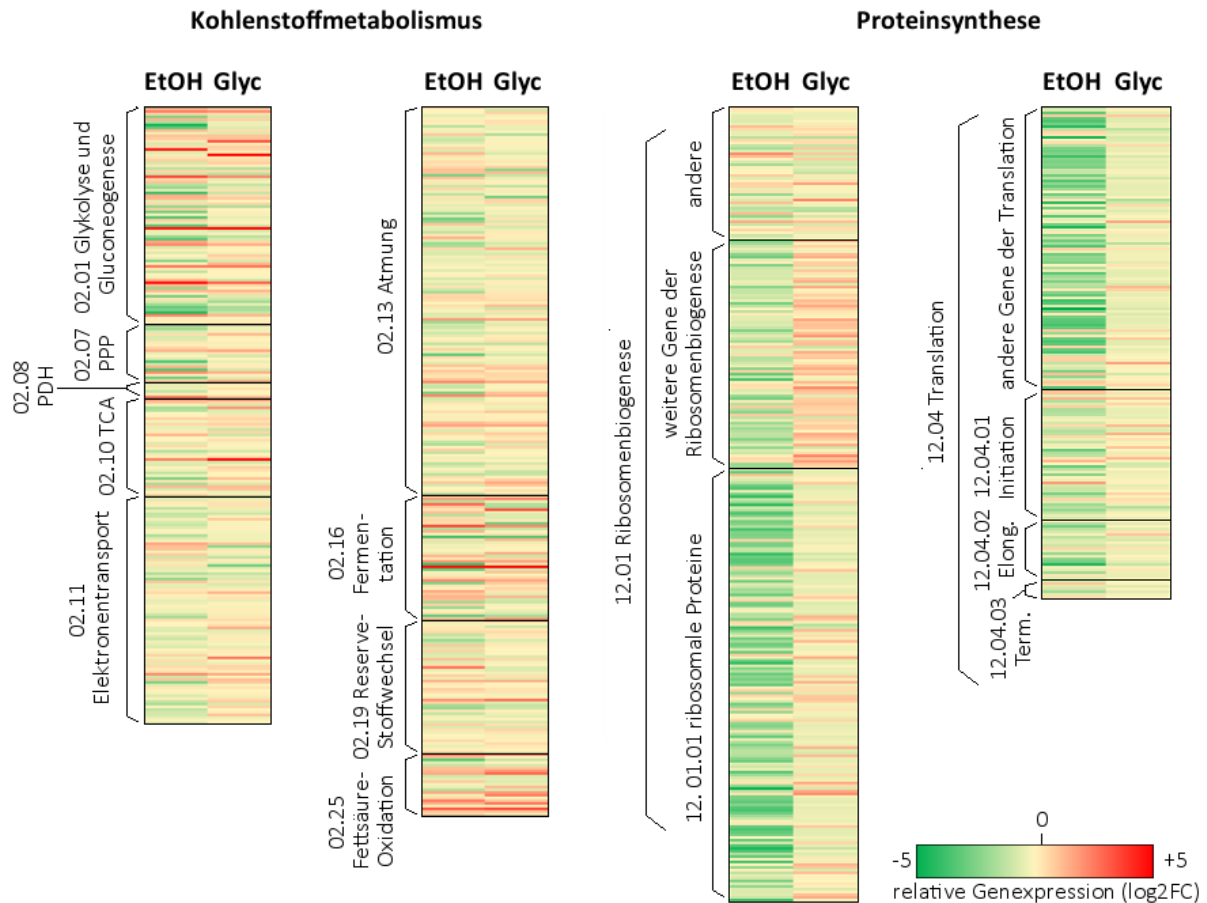
Um diese Fragen zu adressieren, wurde der *K. lactis* Wildtyp in Glukose-Medium angezogen und nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase für zwei Stunden in ethanol- bzw. glycerolhaltiges Medium überführt. Veränderungen in der Genexpression wurden transkriptomweit mittels *Microarrays* untersucht. Die bioinformatische Auswertung erfolgte an jeweils zwei biologischen Replikaten im Verhältnis Ethanol zu Glukose sowie Glycerol zu Glukose. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen den biologischen Replikaten einer Kohlenstoffquelle liegt zwischen 0,993 und 0,997 und ist damit sehr hoch. Durch die verwendeten Arrays konnten 4937 von 5076 annotierten Protein-kodierenden Genen von *K. lactis* abgedeckt werden (Dujon *et al.*, 2004) (siehe Tabelle A8). Die bioinformatische Auswertung der Expressionsdaten ergab, dass 72% aller Gene in Ethanol und 58% aller Gene in Glycerol in ihrem Expressionslevel signifikant verschieden von dem bei Wachstum auf Glukose sind (korrigierter p-Wert im t-Test  $\leq 0,05$ ). Davon werden diejenigen Gene als differentiell exprimiert angesehen, die ein mindestens 2-fach erhöhtes bzw. 2-fach erniedrigtes relatives Transkriptlevel (FC, *fold change*) im Verhältnis zu Glukose aufweisen. Interessanterweise führt ein Glukoseentzug mit gleichzeitiger Zugabe von Ethanol zu einer umfangreicheren Umprogrammierung des Transkriptoms als durch Zugabe von Glycerol (Abbildung 9; 35% differentiell exprimierte Gene (DEGs) in Ethanol, 19% DEGs in Glycerol). Dies spiegelt sich auch in den Pearson-Korrelationskoeffizienten wieder (Ethanol vs. Glukose: 0,823 - 0,855; Glycerol vs. Glukose: 0,925 - 0,929). Aus diesem Grund soll zunächst intensiver auf die Veränderungen durch einen *Shift* auf Ethanol eingegangen werden.



**Abbildung 9: Ethanol verursacht umfangreichere Transkriptomveränderungen als Glycerol.** *Vulcano Plot* zur visuellen Darstellung von Veränderungen im Genexpressionslevel des *K. lactis* Transkriptoms nach zweistündigem *Shift* von Glukose auf **A.** 3% Ethanol bzw. **B.** 3% Glycerol. Geplottet ist das Signifikanzniveau ( $-\log_{10}$  adjusted p-value) gegen relative Expressionslevel ( $\log_2$  fold change (FC)). Als signifikant gilt:  $p \leq 0,05$  (also  $-\log_{10} \geq 1,3$ ) und als differentiell exprimiert gilt:  $FC \leq 0,5$  und  $FC \geq 2,0$  (bzw.  $\log_2 FC \leq -1$  und  $\log_2 FC \geq 1$ ). Blau gekennzeichnet sind alle Datenpunkte, die im Vergleich zu Glukose in Glycerol bzw. Ethanol signifikant hoch bzw. herunter reguliert sind. Berechnung und Grafik von Ioana Lemnian, Inst. f. Bioinformatik (MLU) (Grafik überarbeitet).

### 3.1.1. Einfluss von Ethanol auf metabolische Prozesse

Von 1747 DEGs werden in Ethanol 714 Gene hoch und 1033 Gene herunter reguliert. Um ein generelles Bild dieser Veränderungen im Transkriptom zu bekommen, wurden *Heatmaps* unter Verwendung der relativen Expressionslevel angefertigt (Abbildung 10, exemplarische Kategorien). Eine Analyse der zugrunde liegenden funktionellen Kategorien (MIPS; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>; Ruepp *et al.*, 2004) verdeutlicht zudem signifikante Anreicherung von DEGs innerhalb bestimmter Kategorien (Abbildung 11). Die funktionelle Bedeutung der Gene bezieht sich auf die Angaben zur Annotationen auf den *Microarrays* (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Man beachte außerdem die Hinweise zur Schreibweise von *K. lactis*-Genen im Abschnitt 2.1.1.1. Im Folgenden soll hauptsächlich auf Veränderungen im Kohlenstoffmetabolismus eingegangen werden.

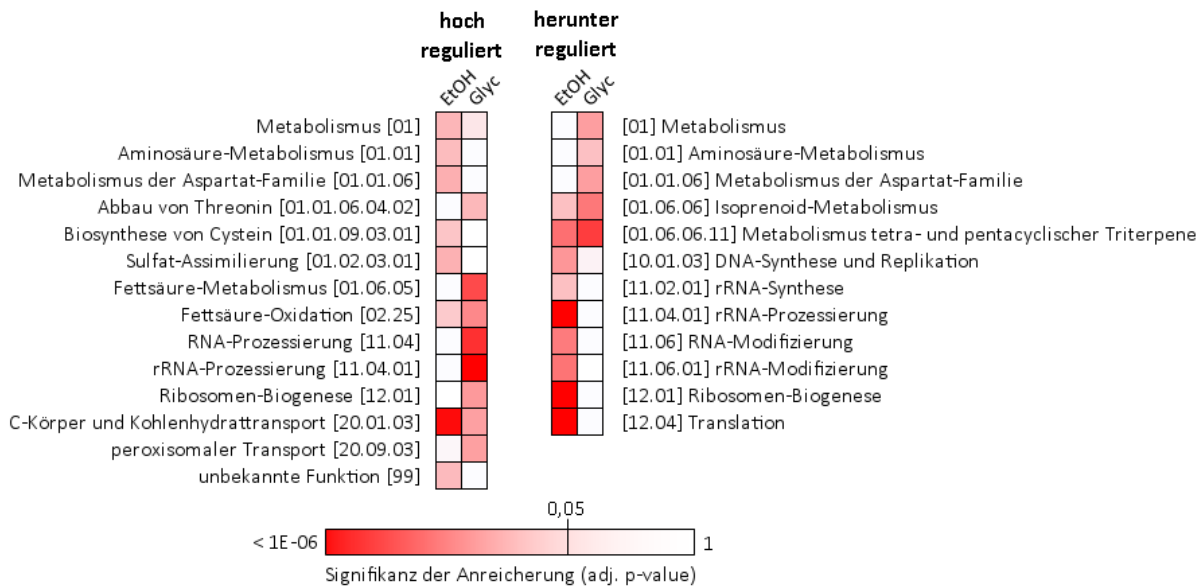


**Abbildung 10: Einfluss von Ethanol und Glycerol auf Genexpression von Kohlenstoffmetabolismus und Proteinbiosynthese.**

*Heatmap*-Diagramm zur Darstellung der relativen Genexpression zwischen Ethanol und Glukose bzw. Glycerol und Glukose von Genen des Kohlenstoffmetabolismus und der Proteinbiosynthese. Differenziell exprimierte Gene sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: grün = herunter reguliert ( $\log_2FC \leq -1$ ) und rot = hoch reguliert ( $\log_2FC \geq +1$ ). Die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen erfolgte nach MIPS-Kategorisierung mit Hilfe der FunCat Datenbank. PPP: Pentosephosphatweg; PDH: Pyruvatdehydrogenase-Komplex; TCA: Citrat-Zyklus; Elong.: Elongation; Term.: Termination.

Wie zu erwarten war, führt die Glukoselimitierung im Medium mit zeitgleicher Zugabe von Ethanol als Kohlenstoffquelle zu massiven Veränderungen der Expression von Genen, die in metabolische Prozesse involviert sind (Abbildung 11). Etwa 41% aller Gene der Kategorie Kohlenstoffmetabolismus bzw. 36% aller Gene in der Kategorie Energieprozesse sind in Ethanol differentiell exprimiert. Wie in *S. cerevisiae* werden auch in *K. lactis* zentrale Regulatoren des Kohlenstoffmetabolismus durch Glukosemangel induziert: darunter zählen neben *KISNF1* (2-fach hoch reguliert) auch die *KISnf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren *KISIP4* (25-fach), *KIERT1* (7,5-fach), *KIRDS2* (2,6-fach) und *KIADR1* (3-fach). *KICAT8* und *KIMIG1* werden durch den *Shift* auf Ethanol nicht differentiell exprimiert (FC 1,5 bzw. 0,8).

Eine schematische Übersicht zu den nun aufgezählten Veränderungen befindet sich in Abbildung 12. Metabolisch betrachtet werden Gene des Glukosestoffwechsels, die sowohl für den Transport als auch für die Verwertung von Glukose über Glykolyse oder PPP benötigt werden, teils stark herunter reguliert (z.B. *KHT1* (Glukosetransporter) 2,6-fach, *KIHXX1* (Glucokinase) 13-fach, *KIPGI1* (Phosphoglucose-Isomerase) 10-fach, *KIFBA1* (Frc-1,6-Bisphosphataldolase) 11-fach, *KISOL4* (6-Phosphogluconlactonase) 3,7-fach, *KIRPE1* (D-Ribulose-5-Phosphat-3-Isomerase) und *KITAL1* (Transaldolase) 2-fach herunter reguliert). Auch Gene des Fermentationsprozesses von Glukose zu Ethanol sind in ihrem Expressionslevel erniedrigt (*KIPDC1* (Pyruvatdecarboxylase) 9-fach und *KIADH1* (Alkoholdehydrogenase) 8-fach herunter reguliert). Das verdeutlicht, dass auch in *K. lactis* ein gewisser Anteil der verfügbaren Glukose fermentiert wird. Im gegenläufigen Prozess, der Gluconeogenese, wird überraschenderweise nur eines der beiden für Schlüsselenzyme kodierenden Gene, *KIPCK1* (PEP-Carboxykinase), hoch reguliert (6-fach), wohingegen *KIFBP1* (Frc-1,6-Bisphosphatase) nicht mehr als 2-fach differentiell exprimiert ist (FC 1,4). Ebenso sind die Gene des TCA-Zyklus größtenteils nicht differentiell exprimiert (nur *KICIT3* (Citratsynthase) und *KILSC2* (Succinyl-CoA-Ligase) sind 5- bzw. 2-fach hoch reguliert), wohingegen Gene, die ausschließlich für den Glyoxylat-Zyklus bedeutend sind, teilweise stark hoch reguliert werden (*KIMDH3* (Malatdehydrogenase) 2-fach, *KIMLS1* (Malatsynthase) 5-fach und *KIICL1* (Isocitratlyase) sogar 12-fach hoch reguliert). Weiterhin findet man eine signifikante Anreicherung für hoch regulierte Gene in den Kategorien Fettsäure-Oxidation (Abbildung 11) (z.B. *KIPOT1* (3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, 9-fach) und *KIFOX2* (3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, 3-fach) hoch reguliert). Das aus dem Fettsäureabbau entstehende Acetyl-CoA kann wiederum in den TCA- und Glyoxylat-Zyklus eingespeist werden. Diese Daten sind daher im Einklang mit der bereits bekannten Bedeutung des Glyoxylat-Zyklus für die Umstellung auf Ethanol als C-Quelle, die in der Bereitstellung von C4-Vorstufen für weitere Biosynthesewege liegt. Vermutlich reicht hierbei der Zelle eine Hochregulierung des *KIPCK1*-mRNA aus, um den Flux von Oxalacetat in die Gluconeogenese zu steigern. Außerdem werden aufgrund des Mangels an Glukose alternative Wege in der Zelle angeschaltet (Fettsäure-Oxidation), um Acetyl-CoA zu gewinnen. Der Fluss durch den TCA-Zyklus wird somit vermutlich aufrechterhalten, weshalb hier keine großen Veränderungen im Expressionslevel der betreffenden Gene beobachtet werden konnten.



**Abbildung 11: Anreicherung vieler DEGs in Kohlenstoffmetabolismus und Proteinsynthese.** *Heatmap* mit signifikant angereicherten MIPS-Kategorien für differentiell exprimierte Gene (DEGs) nach *Shift* auf Ethanol (EtOH) bzw. Glycerol (Glyc). Signifikant angereichert ist eine Kategorie, wenn der p-Wert einer kumulierten, hypergeometrischen Verteilung nach Bonferroni-Korrektur (adjusted p-value) kleiner 0,05 ist (rosa). Je kleiner der p-Wert, umso signifikanter die Anreicherung. Die Analyse wurde separat für hoch und herunter regulierte Gene durchgeführt.

Wie bereits einleitend erwähnt, wird Glukose in *K. lactis* hauptsächlich respiratorisch umgewandelt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein Großteil der zur Atmung gehörigen Gene nicht differentiell exprimiert wird. Interessanterweise werden jedoch einige zentrale Komponenten dieses Prozesses 2- bis 9-fach herunter reguliert (Abbildung 10). Davon sind Untereinheiten oder Regulatoren verschiedener Komplexe der Atmungskette (z.B. Komplex III: *KIQCR6*, *KICYT1*, *KICOR1*, Komplex IV: *KICOX8*, *KICOX12*, *KICOX15*, *KICOX20*, *KIMAM33*) und deren Co-Enzyme (Co-Enzym Q: *KICOX5*, *KICOQ10*), aber auch der F1F0-ATP-Synthase an sich (z.B. *KINCA2*, *KIATP4*, *KITIM12*) betroffen. Diese Daten deuten also auf eine leichte Herunterregulierung der respiratorischen Prozesse in der Zelle hin. Da sich die Zelle erst an das neue Nahrungsangebot anpassen muss, kann sie das Niveau der Energiegewinnung durch Atmung, wie es noch unter Glukose geherrscht hat, vermutlich nicht aufrechterhalten, was in den hier beobachteten reduzierten Transkriptlevels resultiert.

Neben diesen metabolischen Prozessen findet man zudem eine hoch signifikante Anreicherung von Genen, die mit Kohlenstofftransport assoziiert sind (Abbildung 11). So sind beispielsweise *KLLAOB00264g*, kodierend für eine Maltose-Permease, *KLLAOE14653g*, ein putativer Hexosetransporter, und *KLLAOE25015g*, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu ScHxt1 aufweist, 80-, 350- bzw. 47-fach hoch reguliert. Das zeigt, dass die Zelle versucht,



Am stärksten beeinflusst sind neben den aufgezählten Veränderungen im Metabolismus Prozesse zur rRNA-Synthese, rRNA-Prozessierung und Proteinsynthese (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Zwei Stunden nach der Zugabe von Ethanol findet in der Zelle eine umfassende Absenkung der Expressionslevel darin beteiligter Gene um das 2- bis 43-fache statt. Fast die Hälfte aller in diese Kategorien zählenden Gene ist differentiell exprimiert. So werden einige Untereinheiten der RNA-Polymerasen I und III (z.B. *KIRPA34*, *KIRPA12*, *KIRPC25*, *KIRPC34*) sowie Gene zur Assemblierung und Prozessierung der ribosomalen Komplexe herunter reguliert. Dazu zählen unter anderem snRNPs (z.B. *KINOP56*, *KICBF5*, *KINH2*) und Komponenten des SSU (*small subunit*)-Prozessoms (z.B. *KINOP1*, *KIUTP13*, *KIRRP5*) sowie verschiedener pre-ribosomaler Komplexe des 60S-Ribosoms (z.B. *KIRIX1*, *KIIP13*, *KIRRP1*).

Zudem wird die Expression vieler Untereinheiten des zytoplasmatischen 40S- (z.B. *KIRPSOA*, *KIRPS11B*) und 60S-Ribosoms (z.B. *KIRPP2A*, *KIRPL22B*) herabgesenkt, wohingegen nur vier Gene der mitochondrialen Ribosomen herunter reguliert werden (*KIMRP10*, *KIMRP13*, *KIMRPL15*, *KIMRPL39*). Neben diesen rRNA-synthetischen Abläufen sind auch diverse Gene des Translationsprozesses durch ein reduziertes Transkriptlevel gekennzeichnet. Das betrifft Faktoren der Translationsinitiation (z.B. *KITIF2*, *KITIF35*), -elongation (*KIEFB1*, *KICAM1*) und -termination (*KISUP45*) sowie andere daran beteiligte Komponenten (z.B. *KIMAP2* (kodiert für Methionin-Aminopeptidase), *KIPAB1* und *KIPES4* (kodieren für polyA-bindenden Proteine)).

Das Herabsenken der Expressionslevel all dieser Gene verdeutlicht, das *K. lactis* nach einem plötzlich einsetzendem Glukosemangel nicht ohne weiteres mit der Verwertung von Ethanol starten kann. Die Zelle befindet sich eher in einem „Schock“-Zustand, was sich auch in einer veränderten Expression von Genen der Stressantwort (166 DEGs) zeigt. Hierin könnte auch die Anreicherung von Genen in den funktionellen Kategorien „Cystein-Biosynthese“ und „Sulfat-Assimilierung“ begründet sein (Abbildung 11), die teilweise stark hochreguliert werden (z.B. *KIMET1* 9-fach, *KIMET14* 17-fach, *KIMET17* 6-fach und *KICYS3* 2-fach hoch reguliert). Die Assimilierung von Sulfat dient der Bildung der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein, was wiederum in die Biosynthese von Glutathion (durch *KIGSH1*, 2-fach erhöht), einem Tripeptid mit niedrigem Redox-Potential, eingespeist werden kann. Damit könnte die Hochregulierung der Cystein-Biosynthese einen Beitrag dazu leisten, die Zelle vor oxidativen Stress zu schützen, der durch den *Shift* auf Ethanol entsteht (Smart, 2007). Außerdem wird ein Großteil der rRNA- und Proteinsynthese-Maschinerie heruntergefahren und gleichzeitig

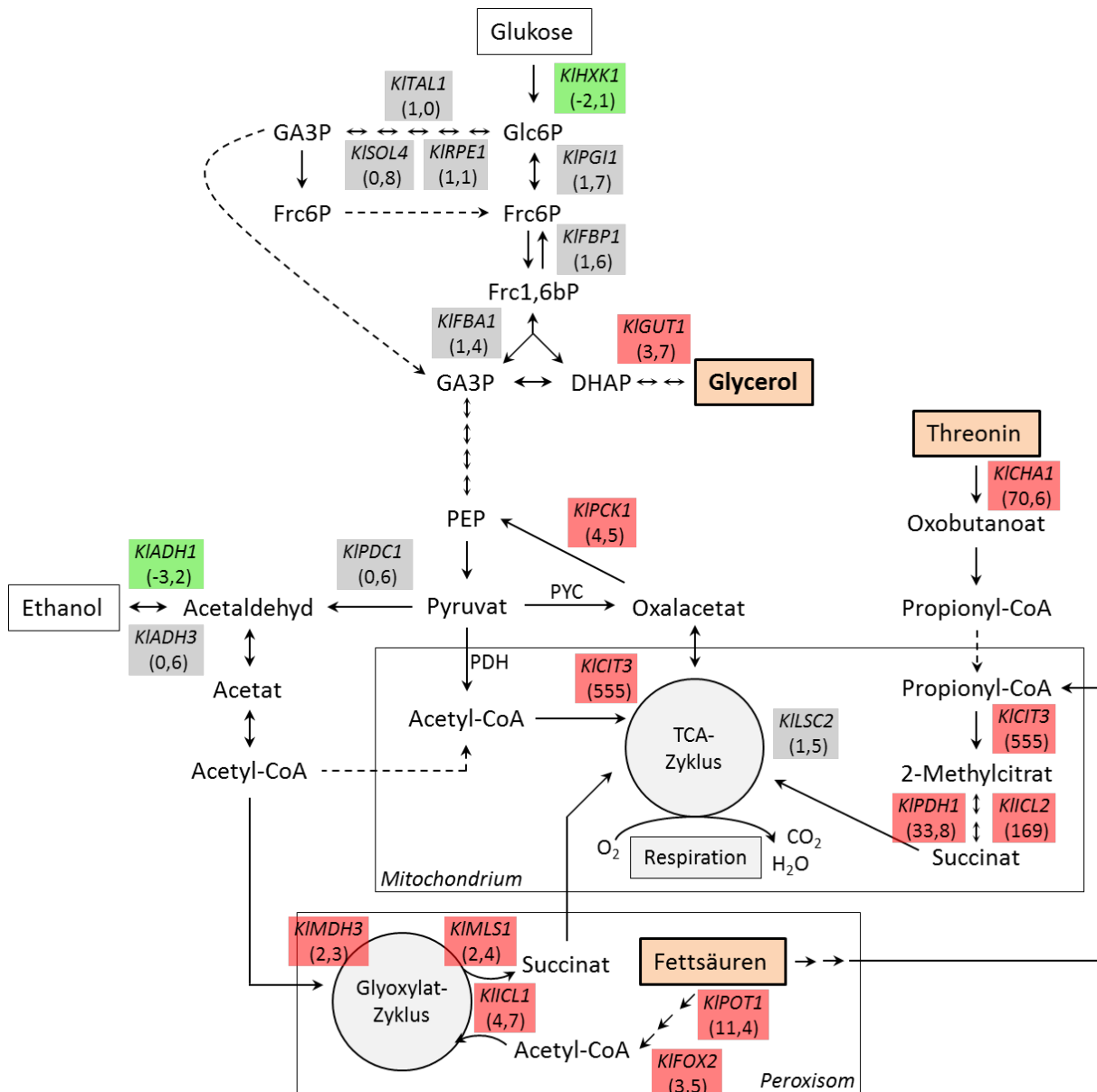


werden Prozesse, die DNA-Synthese und Replikation (Abbildung 11) sowie Zellwachstum und Proliferation betreffen, reduziert, um alle verfügbare Energie zur Adaption an die neuen Umweltbedingungen nutzen zu können.

### 3.1.2. Einfluss von Glycerol auf metabolische Prozesse

In Glycerol werden von insgesamt 949 differentiell exprimierten Genen 396 Gene hoch und 553 Gene herunter reguliert. Auch hier fällt ein Großteil aller DEGs in die Kategorien Kohlenstoffmetabolismus und Energieprozesse, wobei der Prozentsatz deutlich geringer ist als in Ethanol (27% bzw. 22% aller Gene dieser Kategorien sind in Glycerol, 41% bzw. 36% in Ethanol differentiell exprimiert). Im Gegensatz zu Ethanol führt die Umstellung auf Glycerol-Verwertung nicht zu einer Veränderung des Expressionslevels von *KISNF1* (FC 1,1), wohl aber zu einem Anstieg der Transkriptmenge der Transkriptionsfaktoren *KISIP4* (8-fach), *KIERT1* und *KIRDS2* (je 2-fach) sowie *KIADR1* (3-fach). *KICAT8* und *KIMIG1* hingegen sind auch in Glycerol nicht differentiell exprimiert (FC 0,7 (nicht signifikant) bzw. 1,1).

Die Verwertung von Glycerol in der Zelle erfolgt durch *KIGUT1* (Glycerolkinase) und *KIGUT2* (Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase), wobei hier nur das Expressionslevel von *KIGUT2* erhöht ist (4-fach). Im Gegensatz zu Ethanol sind die Gene der Glykolyse und des PPP in Glycerol nicht bzw. nur tendenziell herunter reguliert, also nicht mehr als 2-fach differentiell exprimiert (z.B. *KIPGI1* (Phosphoglucoisomerase) 1,7-fach, *KIFBA1* (Fructose-1,6-Bisphosphataldolase) 1,4-fach und *KIENO1* (Enolase) 1,1-fach herunter reguliert). Genauso wie in Ethanol führt der *Shift* in glycerolhaltiges Medium zur Induktion der *KIPCK1*-Expression (4,5-fach), aber nicht von *KIFBP1* (FC 1,6). Ebenso kommt es kaum zu Veränderungen der Expression der TCA-Zyklus-Gene (mit einer Ausnahme), wohl aber zu einer Hochregulierung zentraler Gene des Glyoxylat-Zyklus (z.B. *KIMDH3* (Malatdehydrogenase) und *KIMLS1* (Malat-synthase) 2-fach, *KIICL1* (Isocitratlyase) 5-fach). Herausgestellt werden muss hierbei jedoch *KICIT3*, das in Glycerol 555-fach hoch reguliert wird und damit das am stärksten regulierte Gen der gesamten *Microarray*-Analyse ist. *KICit3* katalysiert sowohl die Synthese von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA im TCA-Zyklus als auch die Umwandlung von Oxalacetat und Propionyl-CoA zu 2-Methylcitrat, einem Metabolit des Methylcitrat-Zyklus, wobei Cit3 zumindest in *S. cerevisiae* im TCA-Zyklus eher eine untergeordnete Rolle spielt (Graybill *et al.*, 2007).



**Abbildung 13: Glycerol als C-Quelle führt zur starker Induktion des Methylcitrat-Zyklus.**

Schematische Darstellung Glycerol-bedingter Expressionsänderungen im Kohlenstoffmetabolismus. Abgebildet sind relative Expressionswerte einiger Gene zentraler Stoffwechselwege im Verhältnis zu Glukose, wobei für hoch regulierte (rot) sowie nicht differentiell exprimierte Gene (grau) der FC und für herunter regulierte Gene (grün) der negative-reziproke FC (-1/FC) angegeben ist (z.B. *KIADH1*: FC = 0,310 entspricht einer 3,2-fachen Herunterregulierung). Schema adaptiert von Rodrigues *et al.*, 2006.

Der Methylcitrat-Zyklus wurde bereits in Bakterien und der Hefe *Yarrowia lipolytica* gut untersucht und ist auch in vielen anderen Pilzen vorhanden (Tabuchi und Uchiyama, 1975; Pronk *et al.*, 1994; Textor *et al.*, 1997; Gould *et al.*, 2006; Papanikolaou *et al.*, 2013). Erst vor kurzem konnten auch in *K. lactis* Metabolite dieses Stoffwechselwegs nachgewiesen werden (Mates *et al.*, 2014). Auch zwei weitere Gene des Methylcitrat-Zyklus sind induziert. *KIPDH1* (2-Methylcitrat-Dehydratase) und *KIICL2* (2-Methylisocitratlyase), deren Genprodukte in der Umwandlung von 2-Methylcitrat in 2-Methylisocitrat und anschließend die Spaltung in

Succinat und Pyruvat bewerkstelligen, sind 34- bzw. 169-fach hoch reguliert. Der Methylcitrat-Zyklus dient der Verstoffwechslung von Propionyl-CoA, welches bei der Verwertung von ungeradzahligen Fettsäuren sowie durch den Abbau von Threonin und Isoleucin entstehen kann. Interessanterweise zeigt die Analyse der DEGs in Glycerol eine Anreicherung von hoch regulierten Genen in den funktionellen Kategorien „Abbau von Threonin“ und „Fettsäure-Oxidation“ (Abbildung 11), wobei letzteres auch in Ethanol beobachtet wurde. Neben *KICIT3* und *KIICL2* gehört auch *KICHA1*, das für eine Serin/Threonin-Dehydratase kodiert und dessen Expression 70-fach induziert ist, zur Kategorie „Abbau von Threonin“. Die erhöhten Expressionswerte deuten darauf hin, dass in Anwesenheit von Glycerol das im Medium enthaltene Threonin zu Succinat und Pyruvat verstoffwechselt wird. Succinat kann wiederum als C4-Körper in den TCA-Zyklus eingespeist werden. Der Methylcitrat-Zyklus hat damit vermutlich ebenso wie der Glyoxylat-Zyklus eine anaplerotische Bedeutung für den Kohlenstoffwechsel. Vorteilig gegenüber dem Glyoxylat-Zyklus ist jedoch, dass Succinat nicht erst ins Mitochondrium transportiert werden muss.

Im Gegensatz zu Ethanol sind die Gene der Atmung in Glycerol kaum in ihrer Expression verändert (Abbildung 10). Relativ zu Glukose sind in Glycerol gerade einmal 21 von 143 Genen dieser funktionellen Kategorie differentiell exprimiert, wohingegen in Ethanol doppelt so viele Gene dieser Kategorie betroffen sind. Die geringe Veränderung der Expressionslevel von Genen der Atmungskette könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Respiration bei der Verwertung von Glycerol annähernd gleich abläuft wie bei der Nutzung von Glukose als Kohlenstoffquelle.

Den Kohlenstoffmetabolismus insgesamt betrachtend zeigen die hier erhobenen Daten erwartungsgemäß, dass sowohl Ethanol als auch Glycerol induzierend auf die Expression der Gene, die für die Verwertung des jeweiligen Kohlenstoffs benötigt werden, wirken. Allerdings scheint *K. lactis* den C3-Körper Glycerol wesentlich besser verstoffwechseln zu können als den C2-Körper Ethanol. Dihydroxyacetonphosphat, ein Metabolit aus Glycerol, kann sowohl in die Gluconeogenese als auch in die Glykolyse einfließen. Zudem liefern gleich zwei verschiedene anaplerotische Reaktionswege, der Methylcitrat- und der Glyoxylat-Zyklus, C4-Körper für Biosynthese-Prozesse, wobei vor allem der Methylcitrat-Zyklus eine große Rolle zu spielen scheint. Die Gene des Methylcitrat-Zyklus, *KICIT3*, *KIICL2* und *KIPDH1*, werden zwar auch in Ethanol hoch reguliert, aber zu einem wesentlich geringeren Grad als in Glycerol (in Ethanol *KICIT3* 5-fach, *KIICL2* 26-fach, *KIPDH1* 34-fach hoch reguliert). Die starke

Induktion der Gene des Methylcitrat-Zyklus und die damit verbundene anaplerotische Funktion könnten eventuell der Grund dafür sein, weshalb die Gene des Glyoxylat-Zyklus in Glycerol nicht so stark hoch reguliert werden wie in Ethanol.

Neben diesen Veränderungen des Kohlenstoffmetabolismus gibt es weiterhin eine signifikante Anreicherung von herunter regulierten Genen der Kategorie „Metabolismus der Aspartat-Familie“ (Abbildung 11), wobei davon überwiegend Gene zur Sulfat-Assimilierung und Cystein-Biosynthese vermindert exprimiert werden. In Ethanol waren diese Gene hoch reguliert, was mit einer Antwort auf oxidativen Stress via Glutathionproduktion aus Cystein zusammenhängen könnte (siehe Kapitel 3.1.1 und Abbildung 11). Im Gegensatz zu Ethanol löst Glycerol jedoch vermutlich keinen oxidativen Stress aus, zumal Glycerol an sich als Hydroxylradikalfänger fungieren kann (Smirnof und Cumbes, 1989). Möglicherweise ist oxidativer Stress daher in Anwesenheit von Glycerol weniger akut, wodurch auch die beobachtete Herunterregulierung von Genen in der Kategorie „Metabolismus der Aspartat-Familie“ erklärt werden könnte.

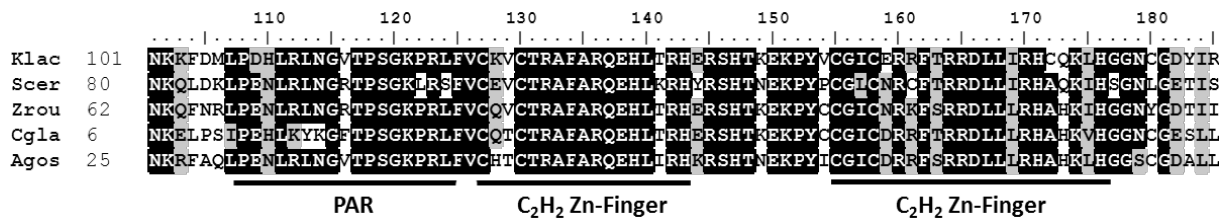
Eine weitere signifikante Anreicherung findet man von Genen, die mit rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese assoziiert sind (Abbildung 11). Auch hier liegt wieder ein deutlicher Unterschied zu Ethanol vor, da diese Gene in Glycerol nicht herunter sondern hoch reguliert werden (Abbildung 10). Der erhöhte Bedarf an Ribosomen lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass für die Verwertung von Glycerol Stoffwechselwege wie der Methylcitrat-Zyklus stark induziert werden. Um die dafür benötigten Enzyme effizient translatieren zu können, werden auch mehr Ribosomen benötigt. Daher könnte im Vergleich zu Glukose eine Hochregulierung von Genen der Ribosomenmaschinerie stattfinden.

### 3.2. Analysen zum Transkriptionsfaktor *KIAdr1*

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors *Adr1* hinsichtlich der Kohlenstoffquellen-abhängigen Regulation der Genexpression wurde in *S. cerevisiae* bereits intensiv untersucht (siehe Kapitel 1.5). Auch in *K. lactis* konnte *KIAdr1* in Zusammenhang mit Kohlenstoff-regulation gebracht werden. Analysen zur basalen Expression von *LAC4* unter dereprimierten Bedingungen verdeutlichten, dass eine Mutation der *Adr1*-Bindestelle im *LAC4*-Promotor zur Verringerung der *Lac4*-Aktivität führt (Schmidt, 1995). Zudem zeigten die *Microarray*-Analysen, dass *KIADR1* durch Ethanol und Glycerol verstärkt exprimiert wird (siehe Kapitel 3.1). Die im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen sollen daher Einblick in die Bedeutung von *KIAdr1* für die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe in der Milchhefe geben. Vergleichende Analysen zwischen *K. lactis* und *S. cerevisiae* können so Gemeinsamkeiten und / oder Unterschiede zwischen den beiden Hefen aufzeigen und ermöglichen damit Schlussfolgerungen zur Bedeutung von *Adr1* als Transkriptionsfaktor und *Adr1*-regulierter Stoffwechselwege.

#### 3.2.1. *KLLA0F013046g* kodiert für ein Homolog von *ScAdr1*

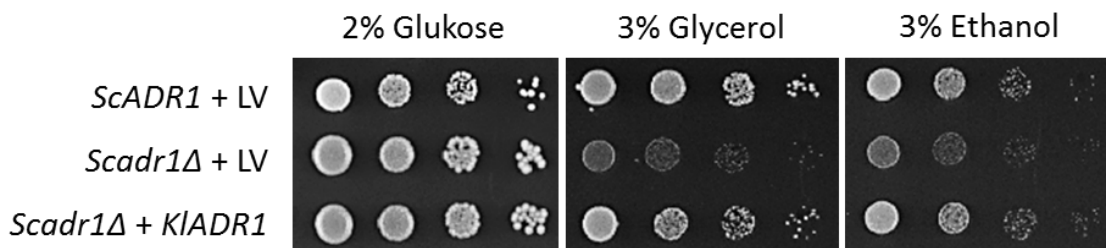
In genomweiten Proteom- und Genomsequenzvergleichen wurde in *Kluyveromyces lactis* das durch den ORF *KLLA0F013046g* kodierte Protein als potentielles *Adr1*-Homolog annotiert ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org), Sherman *et al.*, 2009). Die Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Homolog aus *S. cerevisiae* (*ScAdr1*) beträgt 24% bzw. 41% (Vergleich mit ClustalOmega; Sievers *et al.*, 2011). Wie bereits beschrieben, befindet sich am N-Terminus des Proteins eine DNA-Bindedomäne mit zwei  $C_2H_2$ -Zinkfingermotiven und einer PAR (*proximal accessory region*)-Region (siehe Kapitel 1.5). Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *KLLA0F013046g* sowie weiteren *Adr1*-Homologen verwandter Hefespezies zeigte eine starke Konservierung der Proteinsequenzen in dieser Region (Abbildung 14). Ebenso konserviert sind Serinreste (in *S. cerevisiae* S98 und S230, in *K. lactis* S119 und S313), die in *S. cerevisiae* eine bedeutende Funktion für die Regulation der *Adr1*-Aktivität innehaben (Cherry *et al.*, 1989; Kacherovsky *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Übereinstimmungen wurde *KLLA0F013046g* für weitere Untersuchung ausgewählt.



**Abbildung 14:** Adr1 DNA-Bindedomäne und PAR-Region sind in verschiedenen Hefespezies hoch konserviert.

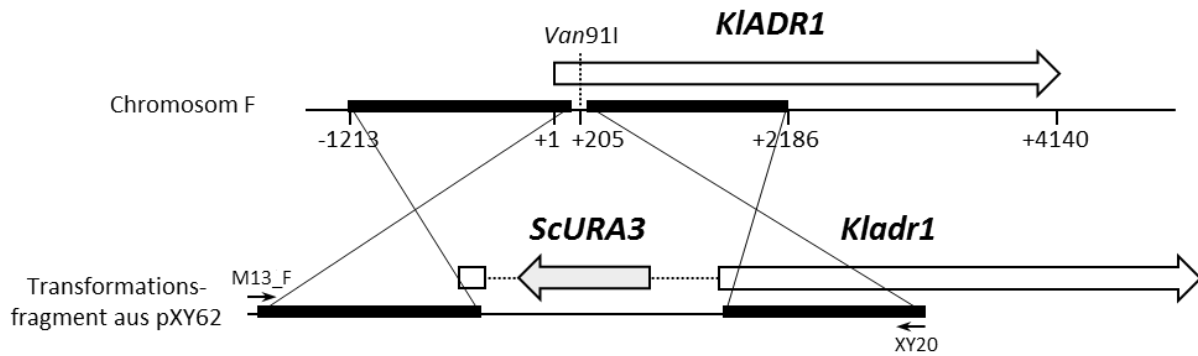
Sequenzvergleich der DNA-Bindedomäne von *K. lactis* KALLA0F13046p (Genbank Accession number CAG98375), *S. cerevisiae* Adr1 (NP\_010502.3), *Z. rouxii* ZYRO0A09416p (XP\_002494776.1), *C. glabrata* CAGLOE04884p (XP\_445900.1) und *A. gossypii* AGR172Wp (NP\_986838.2). Schwarze Boxen markieren identische und graue Boxen Aminosäuren, die nicht identisch sind, aber ähnliche Eigenschaften besitzen. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt und mit BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) bearbeitet.

Dabei stand zunächst die molekulargenetische Charakterisierung im Vordergrund. Mittels einer Komplementationsanalyse wurde zunächst überprüft, ob es sich bei *KLLA0F13046g* tatsächlich um das Homolog zu *ScADR1* handelt. In *S. cerevisiae* führt die Deletion von *ScADR1* zu einer verringerten Expression von Genen, die an der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen wie Glycerol, Ethanol oder Fettsäuren beteiligt sind (Young *et al.*, 2003). Das *KLLA0F13046g*-Gen (-1213 bis 4960; +1 = ATG) wurde in einen centromeren Vektor (YCplac33) kloniert und in einen *ScADR1*-Deletionsstamm von *S. cerevisiae* transformiert. Die phänotypische Analyse zeigt, dass der für die *Scadr1Δ*-Mutante beschriebene Wachstumsdefekt auf Glycerol und Ethanol durch *KLLA0F13046g* komplementiert werden kann (Abbildung 15). Auf der Kontrollplatte mit Glukose zeigen alle Stämme ein vergleichbares Wachstum. In diesem Versuch konnte also gezeigt werden, dass *KLLA0F13046g* (im Folgenden als *KIADR1* bezeichnet) *ScADR1* funktionell ersetzen kann.



**Abbildung 15:** *KIADR1* kann *ScAdr1* funktionell ersetzen.

Wildtyp (W303) und *Scadr1Δ* (CMY186) wurden mit einem Leervektor (LV, YCplac33) und der Deletionsstamm außerdem mit dem *KIADR1*-Allel (pXY102) transformiert. Die Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen und eine serielle Verdünnung auf Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30°C.



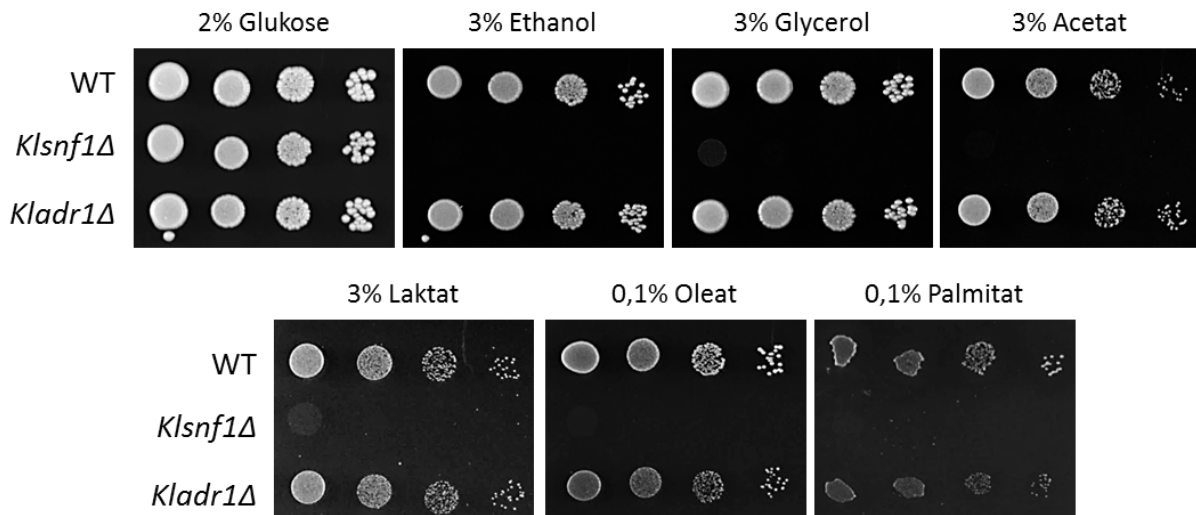
**Abbildung 16: Konstruktion des *Kladr1::ScURA3*-Stammes.**

Schematische Darstellung der Disruption von *KIADR1* mit *ScURA3*. Als lineares Transformationsfragment diente das PCR-Produkt von M13\_FW und XY20 an pXY62. Die für die ortsspezifische Integration benötigten homologen Bereiche sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Positionsangaben beziehen sich auf das Start-ATG (A = +1).

Um die Bedeutung von *Adr1* in *K. lactis* für der Verwertung alternativer Kohlenstoffe zu untersuchen, sollte das *KIADR1*-Gen zerstört werden. Dafür wurde ein Plasmid konstruiert, welches das *KIADR1*-Gen sowie eine *ScURA3*-Kassette trägt, die den Leserahmen von *KIADR1* disruptiert (pXY62). Durch *gene replacement* (siehe 2.1.2) wurde das Wildtyp-*KIADR1* Allel durch das *Kladr1::ScURA3* Allel ersetzt (siehe Abbildung 16). Der daraus entstandene *Kladr1*-Deletionsstamm (KSY11) konnte anschließend hinsichtlich möglicher Wachstumsdefekte auf verschiedenen Kohlenstoffquellen analysiert werden. Neben Wildtyp und *Kladr1* $\Delta$  wurde als Kontrolle der *Klsnf1* $\Delta$ -Stamm mitgeführt, der auf diesen Kohlenstoffquellen die bereits bekannten starken Wachstumsdefekte aufweist (Dong und Dickson, 1997; Mehlgarten *et al.*, 2015). Die phänotypische Analyse zeigt, dass auf der Kontrollplatte mit Glukose alle Stämme vergleichbar wachsen können. Eine Deletion von *KIADR1* hat jedoch auf den hier getesteten Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glycerol, Acetat, Laktat, Oleat und Palmitat) keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 17). *Kladr1* $\Delta$ -Zellen verhalten sich wie Wildtyp-Zellen, wohingegen ein *Klsnf1* $\Delta$ -Stamm unter Anwesenheit von alternativen Kohlenstoffen nicht mehr im Stande ist, zu wachsen.

### 3.2.2. Rolle von *KIAdr1* bei Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen

Die durchgeführten phänotypischen Analysen zeigen, dass *KIAdr1* nicht essentiell für das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen ist. Um zu untersuchen, ob dafür notwendige Gene dennoch *KIAdr1*-abhängig reguliert werden, wurde die Expression verschiedener Schlüsselenzyme der Stoffwechselwege mittels qRT-PCR-Analysen untersucht. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass *ScAdr1* unter anderem die Expression von Genen des Glyoxylat-



**Abbildung 17: Die Deletion von *KIADR1* bewirkt keinen Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen.**

Wildtyp- (JA6), *Klsnf1Δ*- (JSD1) und *Kladr1Δ*-Zellen (KSY11) wurden über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen und eine serielle Verdünnung auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30°C.

Zyklus (*ScICL1*, *ScMLS1*) negativ und Gene des TCA-Zyklus (*ScCIT3*) oder der Fettsäure-Oxidation (*ScFOX2*, *ScPOT1*) positiv reguliert (Young *et al.*, 2003; Tachibana *et al.*, 2005). Berechnet wurden die relativen Expressionslevel dieser Gene von *Kladr1Δ*- im Verhältnis zu Wildtypzellen nach zweistündigem Wachstum in ethanol- bzw. glycerolhaltigen Medium. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Vorab soll hier bemerkt werden, dass eine Hoch- bzw. Herunterregulierung der Genexpression als eine verstärkte bzw. erniedrigte Expression in *Kladr1Δ* im Vergleich zum Wildtyp definiert ist. Die vergleichende Analyse ergab, dass eine Deletion von *KIADR1* in Anwesenheit von Glycerol einen größeren Effekt auf die Expressionslevel der untersuchten Gene hat als in Ethanol. In ethanolhaltigen Medium sind im Vergleich zum Wildtyp fast ausschließlich Expressionsunterschiede für Gene der Fettsäure-Oxidation zu verzeichnen, wobei der Einfluss auf *KIFOX2* größer ist (2,6-fach erniedrigt) als der auf *KIFAA2* und *KIPOT1*, die nur leicht erniedrigt sind. Tendenziell ist auch für *KIACS1*, ein Gen der Ethanolverwertung, ein reduziertes Expressionslevel (1,7-fach erniedrigt) zu verzeichnen. *KIACS1* kodiert für eine Acetyl-CoA-Synthetase, welche besonders beim Wachstum der Zellen auf Ethanol und Acetat bedeutend ist, da es die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat und CoA katalysiert. Gene, die für wichtige Enzyme der Glycerolverwertung und Gluconeogenese sowie des Glyoxylat- und TCA-Zyklus kodieren, sind in *Kladr1Δ* in Ethanol im Vergleich zum Wildtyp nicht differentiell exprimiert.



**Tabelle 7: Expressionslevel von Schlüsselenzymen zur Verwertung alternativer C-Quellen.**

Stoffwechselweg	Genlokus <i>K. lactis</i>	Homolog in <i>S. cerevisiae</i>	Ethanol		Glycerol	
			<i>Kladr1</i> Δ	SD	<i>Kladr1</i> Δ	SD
Glycerol-Verwertung	KLLA0E00595g	<i>GUT1</i>	0,99	0,12	0,79	0,13
	KLLA0A00418g	<i>GUT2</i>	1,13	0,14	1,06	0,19
Ethanol-Verwertung	KLLA0A03333g	<i>ACS1</i>	0,59	0,02	0,25	0,03
	KLLA0D17336g	<i>ACS2</i>	1,25	0,07	1,54	0,11
Fettsäure-Oxidation	KLLA0B11572g	<i>FAA2</i>	0,76	0,17	0,36	0,06
	KLLA0E13817g	<i>FOX2</i>	0,39	0,09	0,35	0,04
	KLLA0F10879g	<i>POT1</i>	0,64	0,14	0,54	0,06
Gluconeogenese	KLLA0A00484g	<i>PCK1</i>	1,12	0,14	1,50	0,34
	KLLA0E01210g	<i>FBP1</i>	1,10	0,09	1,17	0,11
	KLLA0A09185g	<i>ENO1</i>	1,13	0,28	1,62	0,13
Glyoxylat-Zyklus	KLLA0C08107g	<i>ICL1</i>	1,07	0,04	5,19	1,29
	KLLA0F23914g	<i>MLS1</i>	1,06	0,12	3,62	0,58
	KLLA0F12760g	<i>CIT2</i>	1,02	0,03	2,35	0,20
TCA-Zyklus	KLLA0E14235g	<i>CIT3</i>	0,88	0,24	0,06	0,02
	KLLA0F04103g	<i>IDH1</i>	1,13	0,16	1,36	0,05

Zellen vom Wildtyp (JA6) und *Kladr1*Δ (KSY11) wurden zunächst in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Minimalmedium mit 3% Ethanol bzw. 3% Glycerol überführt. Gesamt-RNA wurde isoliert und Expressionslevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* im Verhältnis zum WT. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, SD repräsentiert die Standardabweichung. DEG =  $R \leq 0,55$  bzw.  $R \geq 1,95$ .

In glycerolhaltigem Medium sind im *Kladr1*-Deletionsstamm die Expressionslevel aller drei Gene der Fettsäure-Oxidation und der Acetyl-CoA-Synthetase erniedrigt, wobei der Grad der Herunterregulierung größer ist als in ethanolhaltigem Medium (*KIFAA2* 2,8-fach, *KIFOX2* 2,9-fach, *KIPOT1* 1,9-fach, *KIACS1* 4-fach). Außerdem ist ein Gen des TCA- und Methylcitrat-Zyklus, *KICIT3*, sogar 16,7-fach herunter reguliert. Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit erwähnt, kodiert *KICIT3* für eine mitochondriale Citrat- und Methylcitrat-Synthase. Zudem führt die Deletion von *KIADR1* in Ethanol zur Hochregulierung dreier wichtiger Gene des Glyoxylat-Zyklus (*KIICL1* 5,2-fach, *KIMLS1* 3,6-fach und *KICIT2* (Homolog zu *ScCIT2*) 2,4-fach). Die Expression der Gene zur Glycerolverwertung und der Gluconeogenese sind allerdings auch in Glycerol in *Kladr1*Δ nicht beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *KIAdr1* sowohl in Glycerol als auch in Ethanol *KIACS1* und Gene der Fettsäure-Oxidation positiv reguliert, wobei der Einfluss in Glycerol größer ist als in Ethanol. *KIAdr1* zeigt außerdem eine negative Regulierung von Genen des Glyoxylat-Zyklus, die allein in Glycerol auftritt. Diese Untersuchung gibt daher einen Hinweis

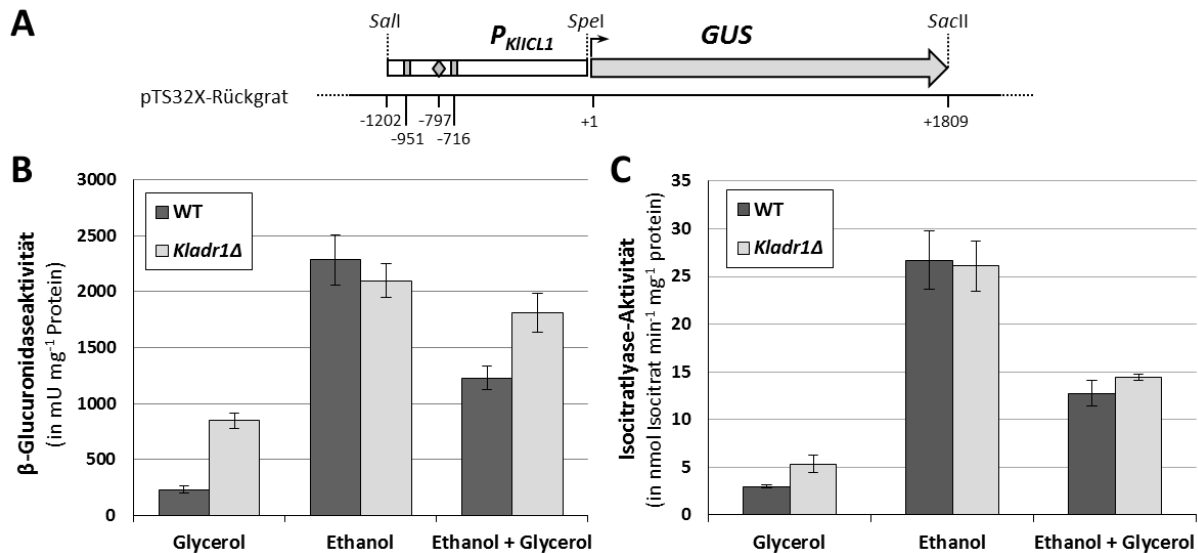
darauf, dass *Adr1* in *K. lactis* wie auch in *S. cerevisiae* (Young *et al.*, 2003) sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann. Über welche molekularen Mechanismen *KIAdr1* als TF wirkt, wurde nachfolgend exemplarisch am *KIICL1*-Promotor untersucht.

### 3.2.3. *KIAdr1* vermittelt Glycerol-Repression am *KIICL1*-Promotor

Vorangegangene Analysen zu *KIICl1* in *K. lactis* ergaben, dass die Zugabe von Glycerol in ethanolhaltiges Medium ein drastisches Absinken der *KIICL1*-Promotor- und Isocitratlyase-Aktivität zur Folge hat. Dieser Repressionseffekt von Glycerol wird durch Regulation von *KIICL1* auf transkriptioneller Ebene hervorgerufen (Rodicio *et al.*, 2008). Da eine *KIADR1*-Deletion in glycerolhaltigem Medium zu einer 4-fachen Hochregulierung von *KIICL1* führt, sollte untersucht werden, inwiefern der durch Glycerol hervorgerufene Repressionseffekt *KIAdr1*-abhängig ist. Zur Analyse der Promotoraktivität von  $P_{KIICL1}$  wurden Wildtyp- und *Kladr1* $\Delta$ -Zellen mit einem *multi copy*-Vektor transformiert, auf dem ein  $P_{KIICL1}$ -*GUS*-Reporterkonstrukt vorliegt (pXY89, Abbildung 18A). Die Messung der  $P_{KIICL1}$ -Promotoraktivität erfolgte über die Ermittlung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (Abbildung 18B). Außerdem wurde in den beiden untransformierten Stämmen die Isocitratlyase-Aktivität ermittelt (Abbildung 18C).

Wie bereits in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Tabelle 7), führt auch in den hier durchgeführten Experimenten die Deletion von *KIADR1* in Glycerol zu einem Anstieg der *KIICL1*-Promotoraktivität um das 3,7-fache (Abbildung 18B) bzw. der *Icl1*-Aktivität um das 1,8-fache (Abbildung 18C). In Ethanol ist kein Unterschied zum Wildtyp zu verzeichnen. In zugleich induzierenden und reprimierenden Bedingungen (Ethanol und Glycerol) wird deutlich, dass der reprimierende Effekt von Glycerol in *Kladr1* $\Delta$  bezüglich der Promotoraktivität deutlich abgeschwächt ist. Im Wildtyp verursacht die Zugabe von Glycerol in induzierendes Medium ein Absinken der *KIICL1*-Promotoraktivität um 50%, in *Kladr1* $\Delta$  lediglich um 17% (Abbildung 18B). Bezüglich der Isocitratlyase-Aktivität ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *Kladr1* $\Delta$  ersichtlich (Verringerung der Aktivität durch Zugabe von Glycerol um 50% im WT bzw. 55% in *Kladr1* $\Delta$ ) (Abbildung 18C). Der Grund dafür liegt vermutlich an der kurzen Inkubationszeit (2 Stunden) der Kulturen in den alternativen Kohlenstoffquellen. Bei längerer Kultivierung können *KIICl1*-Aktivitätswerte von 160 nmol Isocitrat min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein erzielt werden (Krijger, 2002). Wahrscheinlich würde der Einfluss der *KIADR1*-Deletion auf die Isocitratlyase-Aktivität bei längeren

Inkubationszeiten besser zu sehen sein. Die Ergebnisse dieser Untersuchung verdeutlichen, dass *KIAdr1* für die durch Glycerol vermittelte Repression von *KIICL1* eine wichtige Rolle spielt. Die Deletion von *KIADR1* resultiert in einem fast vollständigen Verlust der Glycerol-Repression auf Ebene der Promotoraktivität.



**Abbildung 18: Einfluss von *KIADR1* auf Glycerol-vermittelte Repression von *KIICL1*.**

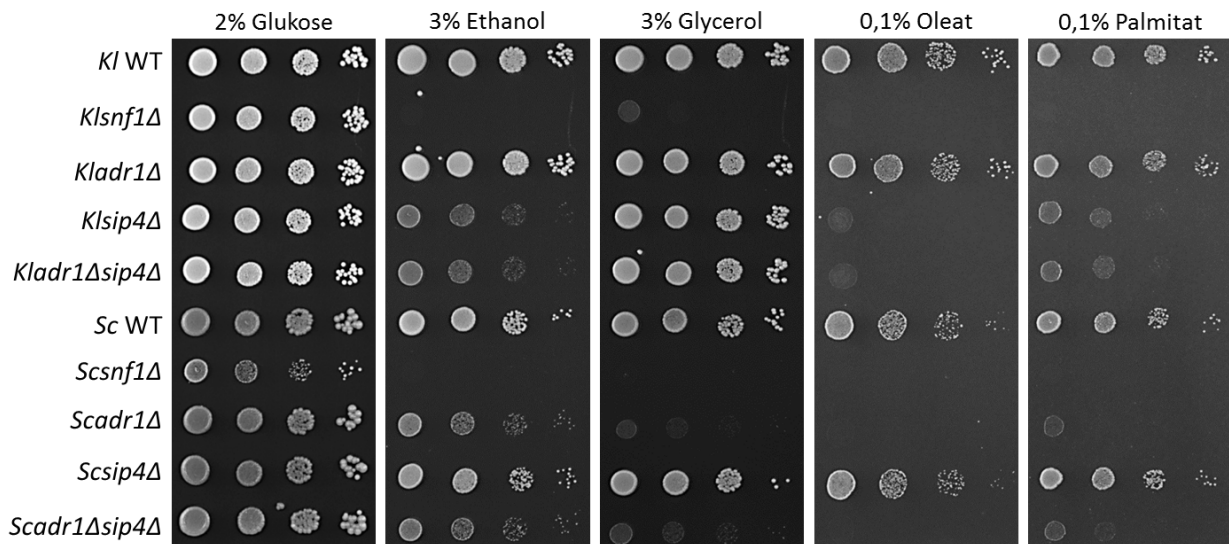
**A.** Schematische Darstellung des *P<sub>KIICL1</sub>-GUS*-Fusionskonstrukts (pXY89) zum Nachweis der Promotoraktivität von *KIICL1*. □ potentielle *KIAdr1*-Bindestelle (Konsensus: TGGRG); ◇ CSRE, *KISip4*-Bindestelle (Konsensus: CGG(N)<sub>6</sub>GG). **B.** Wildtyp- (JA6) und *Kladr1Δ*-Zellen (KSY13) wurden mit *P<sub>KIICL1</sub>-GUS* (pXY89) transformiert, in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit je 3% der angegebenen C-Quelle überführt. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und die *KIICL1*-Promotoraktivität indirekt durch die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase ermittelt. **C** Wildtyp (JA6) und *Kladr1Δ* (KSY11) wurden auf gleiche Weise wie in B. in Minimalmedium (alle AS/B) angezogen. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und die Isocitratlyase-Aktivität bestimmt. Die Werte für die Messungen in Glycerol lagen knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die Standardabweichung errechnet sich in beiden Analysen aus jeweils drei biologischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten.

### 3.2.4. *KIAdr1* und *KISip4* co-regulieren die *KIICL1*-Aktivität

Die Isocitratlyase ist ein zentrales Enzym des Glyoxylat-Zyklus und katalysiert die Spaltung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat. In *K. lactis* spielt der Glyoxylat-Zyklus eine essentielle Rolle bei der Verwertung von C2-Körpern wie Ethanol und Acetat, ist aber weniger bedeutend für die Nutzung des C3-Körpers Glycerol (Krijger, 2002). Die Aktivierung von *KIICL1* erfolgt durch die Bindung von *KISip4* an CSRE-Elemente im Promotor (Mehlgarten *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass auch *KIAdr1* an der Regulation von *KIICL1* beteiligt ist, indem es in Anwesenheit von Glycerol die Genexpression reprimiert.

Um ein mögliches Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren aufzudecken, wurden in *S. cerevisiae* und *K. lactis* *adr1Δsip4Δ* Doppelmutanten generiert. Dafür wurde in einem *Scadr1Δ*-Stamm eine *ScSIP4*-Deletion durch *gene replacement* mit dem *HIS5*-Gen aus *S. pombe* bewerkstelligt (siehe 2.1.2). Die Disruption von *KIADR1* in einem *Ksip4Δ*-Stamm erfolgte analog zur Konstruktion des *Kladr1Δ*-Stammes (siehe Kapitel 3.2.1 und Abbildung 16). Inwiefern sich in *S. cerevisiae* bzw. *K. lactis* eine zusätzliche Deletion von *SIP4* im *adr1Δ*-Hintergrund hinsichtlich möglicher Wachstumsdefekte auf alternativen Kohlenstoffen auswirkt, wurde zunächst phänotypisch untersucht. Für beide Hefen wurde neben Wildtyp, *adr1Δ*, *sip4Δ* und *adr1Δsip4Δ* zusätzlich ein *snf1Δ*-Stamm als Kontrolle mitgeführt. Die phänotypische Analyse zeigt, dass alle untersuchten Stämme auf 2% Glukose vergleichbar gut wachsen können und dass eine *SNF1*-Deletion in *K. lactis* und *S. cerevisiae* zu großen Wachstumsdefiziten auf alternativen Kohlenstoffquellen führt (Abbildung 19). Wie bereits aus Abbildung 17 ersichtlich, führt die Deletion von *ADR1* in *K. lactis* zu keinem Wachstumsdefekt auf den hier untersuchten C-Quellen. Eine *KISIP4*-Deletion hingegen führt auf Ethanol, Oleat und Palmitat, nicht aber auf Glycerol, zu schwachen bis starken Wachstumsdefiziten. Die essentielle Bedeutung von *KISIP4* für die Verwertung von C2-Körpern konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden (Mehlgarten *et al.*, 2015). Mit diesen Analysen konnte nun erstmals auch die Bedeutung von *KISip4* für die Verwertung von Fettsäuren gezeigt werden, wobei der Einfluss der *KISIP4*-Deletion auf das Wachstum auf ungesättigten Fettsäuren (Oleat) anscheinend größer ist als auf gesättigten Fettsäuren (Palmitat).

Die gleichzeitige Deletion von *KIADR1* und *KISIP4* gleicht im Wachstum auf allen getesteten C-Quellen dem der *KISIP4*-Einzeldelation. Wie zu erwarten war, bewirkt eine *ScADR1*-Deletion in *S. cerevisiae* vor allem auf Glycerol, Oleat und Palmitat stark vermindertes Wachstum (Young *et al.*, 2003), wohingegen eine *ScSIP4*-Deletion im Wachstum auf allen getesteten Kohlenstoffen dem des Wildtyps gleicht. Die zusätzliche Deletion von *ScSIP4* im *Scadr1Δ*-Hintergrund verhält sich im Wachstum wie eine *ScADR1*-Einzeldelation. Zusammenfassend kann man sagen, dass in *K. lactis* der Einfluss von *KISip4* zur Verwertung alternativer C-Quellen größer ist als der von *KIAdr1* und dass diese Bedeutung von *ScSip4* in *S. cerevisiae* verloren gegangen ist (siehe auch Mehlgarten *et al.*, 2015).

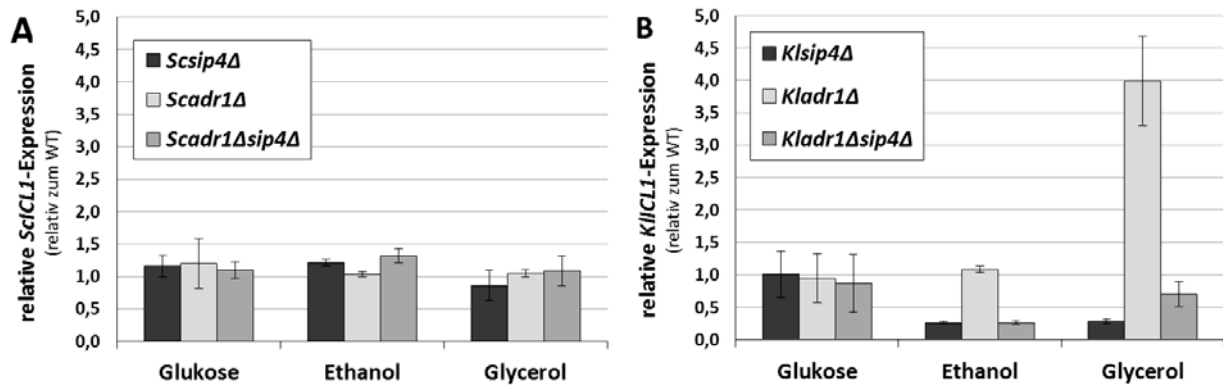


**Abbildung 19: *adr1Δsip4Δ*-Mutante bewirkt keinen zusätzlichen Wachstumsdefekt.**

*K. lactis* Wildtyp- (JA6), *Klsnf1Δ*- (JSD1), *Kladr1Δ*- (KSY11), *Klsip4Δ*- (JA6/DS4) und *Kladr1Δsip4Δ*-Zellen (KSY25) und *S. cerevisiae* Wildtyp- (W303-1a), *Scsnf1Δ*- (CMY178), *Scadr1Δ*- (CMY186), *Scsip4Δ*- (CMY187) und *Scadr1Δsip4Δ*-Zellen (KSY27) wurden über Nacht in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose angezogen und eine serielle Verdünnung auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30°C.

Anhand der phänotypischen Analysen (Abbildung 19) konnte keine Aussage über ein mögliches Zusammenspiel von *KlAdr1* und *KlSip4* getroffen werden. Daher wurde anschließend in beiden Hefen die *ICL1*-Expression in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von *Sip4* und *Adr1* sowie in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 20). Dafür wurden jeweils *adr1Δ* und *sip4Δ* Einzel- als auch die *adr1Δsip4Δ* Doppelmutante sowie der dazugehörige Wildtyp in *K. lactis* und *S. cerevisiae* untersucht. Berechnet wurden die relativen Expressionslevel der jeweiligen Mutante im Verhältnis zum Wildtyp unter reprimierenden Bedingungen (2% Glukose) und nach zweistündigem Wachstum in 3% Ethanol bzw. 3% Glycerol.

Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen zeigt, dass in *S. cerevisiae* in diesem Versuchsaufbau weder eine Deletion von *ScADR1* noch von *ScSIP4* einen Einfluss auf das Expressionslevel von *ScICL1* hat (Abbildung 20A). Sowohl unter reprimierenden als auch unter induzierenden Wachstumsbedingungen verhalten sich die untersuchten Einzel- und Doppelmutanten wie der Wildtyp. Für *K. lactis* zeichnet sich allerdings ein anderes Bild ab (Abbildung 20B). Unter reprimierenden Bedingungen (2% Glukose) entspricht der *KlICL1*-Expressionslevel von *Kladr1Δ*, *Klsip4Δ* und *Kladr1Δsip4Δ* dem des Wildtyps.



**Abbildung 20: *Klsip4Δ* verhält sich epistatisch über *Kladr1Δ*.**

**A.** *S. cerevisiae*-Zellen vom Wildtyp (W303-1a), *Scsip4Δ* (CMY187), *Scadr1Δ* (CMY186) und *Scadr1sip4Δ* (KSY27) sowie **B.** *K. lactis*-Zellen vom Wildtyp (JA6), *Klsip4Δ* (JA6/DS4), *Kladr1Δ* (KSY11) und *Kladr1Δsip4Δ* (KSY25) wurden zunächst in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Medium mit 3% Ethanol bzw. 3% Glycerol überführt. Gesamt-RNA wurde isoliert und das *ICL1*-Expressionslevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* bzw. *ScIPP1* im Verhältnis zum WT. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Differenziell exprimiert, wenn  $R < 0,5$  bzw.  $R > 2,0$ .

Wie zu erwarten war, führt die *KISIP4*-Deletion in Anwesenheit von Glycerol oder Ethanol zur 4-fachen Reduktion der *KIICL1*-Expression. Die *KIADR1*-Deletion resultiert in Glycerol in einer 4-fachen Induktion des Transkriptlevels, wohingegen in Ethanol kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen ist. Interessanterweise geht dieser Effekt von *Kladr1Δ* in Glycerol verloren, wenn zusätzlich *KISIP4* deletiert ist. Das zeigt, dass hier ein epistatischer Effekt von *Klsip4Δ* über *Kladr1Δ* vorliegt und dass *KISip4* nötig ist, um die Hochregulierung von *KIICL1* im *Kladr1Δ*-Stamm in Glycerol zu vermitteln. *KIICL1* wird also durch *KIAdr1* und *KISip4* co-reguliert.

Um ein generelles Bild dieser Co-Regulation zu erhalten, wurden die Expressionslevel 14 weiterer Gene, die bereits als Zielgene von *KISip4* identifiziert werden konnten (Mehlgarten *et al.*, 2015), bezüglich ihrer Abhängigkeit von *KIAdr1* und *KISip4* mittels qRT-PCR untersucht (Tabelle 8). Betrachtet man relativen Expressionswerte für Gene des Glyoxylat-Zyklus in Anwesenheit von Glycerol, so fällt auf, dass *KICIT2* und *KIMLS1* wie *KIICL1* in *Kladr1Δ* hoch reguliert (*KICIT2* 2,5-fach, *KIMLS1* 3,5-fach) und in *Klsip4Δ* mehr oder weniger stark herunter reguliert werden (*KICIT2* 1,3-fach, *KIMLS1* 2,3-fach). In der *Kladr1Δsip4Δ* Doppelmutante geht der Effekt der *KIADR1*-Deletion verloren. In ethanolhaltigem Medium führt die Deletion von *KISIP4* zwar gleichermaßen wie in Glycerol zu einer 4-fachen Herunterregulierung von *KIICL1* und *KIMLS1*, die Deletion von *KIADR1* hingegen hat keinen Einfluss auf die Genexpression. Die *Kladr1Δsip4Δ* Doppelmutante gleicht der *Klsip4Δ* Einzelmutante.

**Tabelle 8: Einfluss von *Kladr1Δsip4Δ* auf die Expression *KISip4*-abhängiger Gene.**

Stoffwechselweg	Gen	Glycerol						Ethanol					
		<i>adr1Δ</i>	SD	<i>sip4Δ</i>	SD	<i>adr1Δ sip4Δ</i>	SD	<i>adr1Δ</i>	SD	<i>sip4Δ</i>	SD	<i>adr1Δ sip4Δ</i>	SD
Glyoxylat-Zyklus	<i>KIICL1</i>	4,22	1,22	0,24	0,06	0,61	0,22	1,02	0,04	0,25	0,01	0,25	0,01
	<i>KICIT2</i>	2,45	0,41	0,81	0,10	1,55	0,14	1,04	0,09	1,14	0,10	1,20	0,05
	<i>KIMLS1</i>	3,56	0,89	0,42	0,08	0,84	0,17	1,10	0,06	0,22	0,03	0,25	0,03
TCA-Zyklus	<i>KIACO1</i>	1,58	0,30	0,88	0,09	1,05	0,08	1,15	0,09	0,91	0,07	0,91	0,04
	<i>KIMDH3</i>	1,14	0,22	0,89	0,14	0,84	0,16	1,29	0,43	1,14	0,40	1,09	0,41
Acetyl-CoA-Synthese	<i>KIACS1</i>	0,23	0,02	0,57	0,09	0,10	0,01	0,60	0,04	0,84	0,09	0,48	0,03
	<i>KIACS2</i>	1,40	0,16	1,29	0,11	1,58	0,06	1,12	0,05	0,24	0,05	0,26	0,03
Carnitin-Shuttle	<i>KIYAT1</i>	1,47	0,16	0,82	0,13	0,56	0,09	1,11	0,06	0,54	0,03	0,47	0,04
	<i>KIYAT2</i>	1,88	0,22	0,71	0,18	0,60	0,12	1,13	0,05	0,39	0,03	0,33	0,05
	<i>KICAT2</i>	0,82	0,15	0,65	0,13	0,30	0,05	0,97	0,05	0,64	0,10	0,53	0,06
	<i>KICRC1</i>	0,98	0,22	0,72	0,19	0,38	0,09	0,89	0,06	0,55	0,10	0,42	0,03
andere	<i>KINTR2</i>	1,02	0,06	4,60	0,11	5,44	0,35	0,94	0,19	4,78	0,77	5,65	0,30
	<i>KITRR1</i>	1,50	0,08	0,71	0,13	0,89	0,14	1,35	0,22	2,44	0,54	2,39	0,55
	<i>KIPEX21</i>	1,19	0,19	0,65	0,13	0,81	0,20	1,16	0,03	0,20	0,05	0,22	0,02

Zellen vom Wildtyp (JA6), *Kladr1Δ* (KSY11), *KIsip4Δ* (JA6/DS4) und *Kladr1Δsip4Δ* (KSY25) wurden zunächst in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Medium mit 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamt-RNA wurde isoliert und Expressionslevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* im Verhältnis zum WT. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, SD repräsentiert die Standardabweichung. DEG =  $R < 0,55$  bzw.  $R > 1,95$ .

Die Expression von *KICIT2* hingegen ist in Ethanol weder von *KIADR1* noch von *KISIP4* abhängig. *KIICL1* sowie *KIMLS1* werden also sowohl in Glycerol als auch in Ethanol von *KISip4* induziert, aber ausschließlich in Glycerol durch *KIAdr1* reprimiert. Im Gegensatz zum Glyoxylat-Zyklus werden die zwei getesteten Gene des TCA-Zyklus (*KIACO1* und *KIMDH3*) in den hier durchgeführten Experimenten sowohl in Glycerol als auch in Ethanol weder durch die Deletion von *KIADR1* noch von *KISIP4* beeinflusst.

Analysiert man Gene der Acetyl-CoA-Synthese, so fällt auf, dass in Glycerol *KIACS1* in beiden Einzelmutanten herunter reguliert wird (*Kladr1Δ* 4-fach, *KIsip4Δ* 2-fach) und dass sich dieser Effekt in der Doppelmutante sogar addiert (*Kladr1Δsip4Δ* 10-fach). Diese Regulation ist in abgeschwächter Form auch in Ethanol zu beobachten (*Kladr1Δ* 1,7-fach, *KIsip4Δ* 1,2-fach, *Kladr1Δsip4Δ* 2-fach herunter reguliert). Für *KIACS2* ist in Glycerol kein signifikanter Einfluss der Einzel- oder Doppelmutation zu beobachten. In Ethanol ist das *KIACS2*-Expressionslevel jedoch in *KIsip4Δ* und *Kladr1Δsip4Δ* 4-fach herunter reguliert, nicht aber in *Kladr1Δ*. Für die

Acetyl-CoA-Synthese vermitteln also *KIAdr1* und *KISip4* additiv die *KIACS1*-Genexpression in Glycerol und Ethanol, wohingegen *KIACS2* nur in Ethanol durch *KISip4* induziert wird.

Des Weiteren sticht hervor, dass Gene des Carnitin-Shuttles in Anwesenheit von Glycerol in der *Kladr1Δsip4Δ*-Doppelmutante herunter reguliert werden (*KIYAT1* 1,8-fach, *KIYAT2* 1,7-fach, *KICAT2* 3,3-fach, *KICRC1* 2,6-fach). Auch in der *KIsip4Δ* Einzelmutante ist tendenziell eine Herunterregulierung dieser Gene zu verzeichnen (1,2- bis 1,5-fach), wohingegen in *Kladr1Δ* kein verändertes (*KICAT2*, *KICRC1*) oder eher ein erhöhtes Expressionslevel (*KIYAT1* 1,5-fach, *KIYAT2* 1,9-fach) auftritt. Die deutlichere Reduzierung der Transkriptlevel in *Kladr1Δsip4Δ* könnte auch hier für einen additiven Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren sprechen. In Anwesenheit von Ethanol hat die *KIADR1*-Deletion keinen Einfluss auf die Expression der Gene des Carnitin-Shuttles; im Gegensatz dazu führt die Deletion von *KISIP4* zu einer 2- bis 3-fachen Herunterregulierung der Transkriptlevel. *KISip4*, nicht aber *KIAdr1*, induziert also die Expression der Carnitin-Shuttle-Gene *KIYAT1*, *KIYAT2*, *KICAT2* und *KICRC1* in ethanolhaltigem Medium, wogegen in glycerolhaltigem Medium ein additiver Effekt von *KIAdr1* und *KISip4* vorhanden sein könnte.

Neben Genen, die im Kohlenstoffmetabolismus involviert sind, gibt es außerdem weitere *KISip4*-abhängig regulierte Gene. Die Transkriptlevel von *KIPEX21*, dessen Genprodukt in den Transport von Proteinen in das Peroxisom involviert ist, sind in Ethanol in *KIsip4Δ* und *Kladr1Δsip4Δ* deutlich herunter reguliert (5-fach), aber von einer *KIADR1*-Deletion unbeeinflusst. In glycerolhaltigem Medium ist der gleiche Trend in deutlich abgeschwächter Form zu erkennen. *KINTR2*, das für ein an der Disassemblierung von Spliceosomen beteiligtes Protein kodiert, und *KITRR1*, das für eine Thioredoxin-Reduktase kodiert, sind Gene, die von *KISip4* negativ reguliert werden. In den hier durchgeführten Analysen zeigen *KIsip4Δ* bzw. *Kladr1Δsip4Δ* eine 4,6- bis 5,6-fache Hochregulierung von *KINTR2* sowohl in Glycerol als auch in Ethanol sowie eine 2,4-fache Hochregulierung von *KITRR1* in Ethanol, nicht aber in Glycerol. Beide Gene zeigen Wildtyp-ähnliche Expressionslevel in *Kladr1Δ* in beiden C-Quellen.

Insgesamt gesehen ist der Einfluss von *KIAdr1* auf die Genexpression der hier untersuchten Gene in Glycerol wieder größer als in Ethanol: nur in Glycerol konnte im *Kladr1Δ*-Stamm ein zum Wildtyp verschiedenes Transkriptlevel von *KIICL1*, *KICIT2*, *KIMLS1* und *KIACS1* nachgewiesen und ein additiver Effekt von *KIAdr1* mit *KISip4* für *KIACS1* und eventuell auch



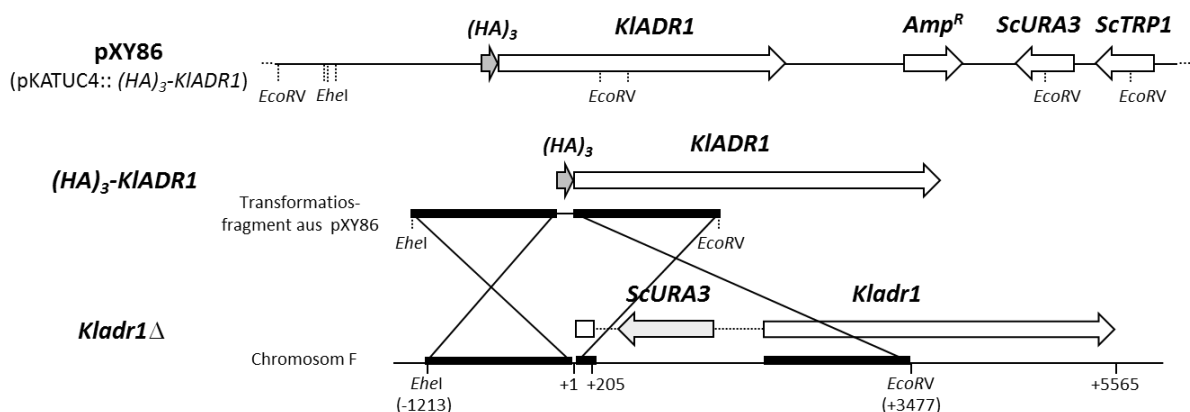
für die Carnitin-Shuttle-Gene gezeigt werden. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von *KISip4* in Ethanol anscheinend bedeutender: bei der Mehrheit der hier untersuchten Gene ist der Expressionsunterschied zwischen *Klip4Δ* und Wildtyp in Ethanol größer als in Glycerol. Zudem sollte bemerkt werden, dass fünf der 14 Gene im *Klip4Δ*-Stamm nicht als differentiell exprimiert angesehen werden können, obwohl für diese Gene bereits eine deutliche Reduktion der Expression in Folge einer *KISIP4*-Deletion nachgewiesen werden konnte (*KIACS1* 2,5-fach, *KICIT2* 33-fach, *KIACO1* 2-fach, *KIMDH3* 2-fach, *KICAT2* 4-fach, Mehlgarten *et al.*, 2015; teilweise unveröffentlicht).

### 3.2.5. Charakterisierung der Bindung von *KIAdr1* am *KIICL1*-Promotor

In mehreren unabhängigen Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *KIAdr1* einen negativen Einfluss auf die Expression von *KIICL1* in Anwesenheit von Glycerol hat. Ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt handelt, soll in den nun folgenden Untersuchungen geklärt werden.

#### 3.2.5.1. *KIAdr1* bindet am *KIICL1*-Promotor

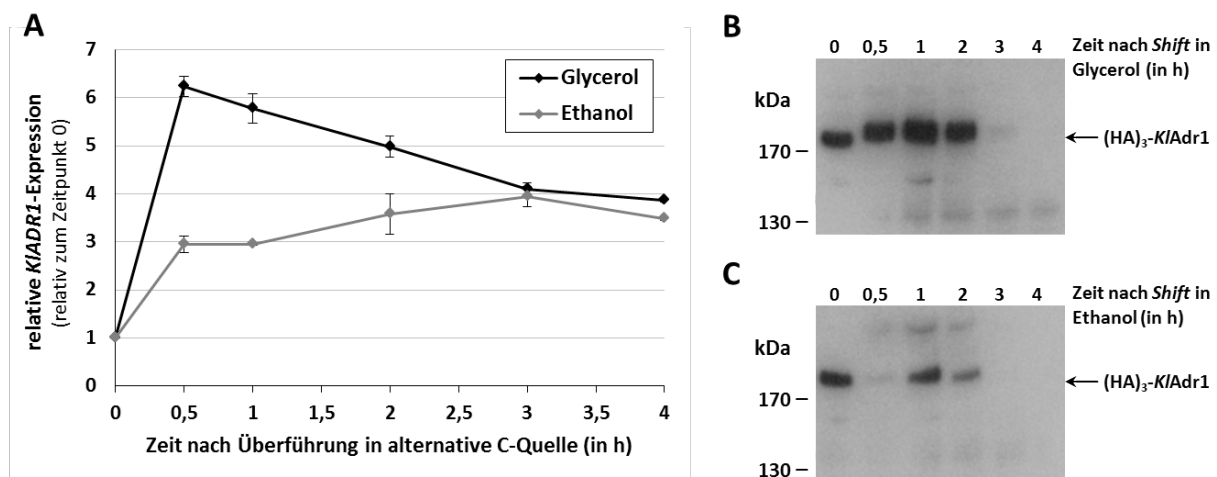
*In silico* Untersuchungen am *KIICL1*-Promotor sagen zwei potentielle Bindestellen für *KIAdr1* vorher (Konsensus-Sequenz 5'-TGGRG-3'). Um zu überprüfen, ob *KIAdr1* überhaupt am *KIICL1*-Promotor bindet, wurde ein N-terminal HA-epitopmarkierter *KIAdr1*-Stamm konstruiert (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Konstruktion eines  $(HA)_3$ -*KIADR1* Stammes**

Schematische Darstellung der chromosomalen HA-Epitopmarkierung von *KIADR1*. pXY86 (hier linear dargestellt) wurde mit den Enzymen *Ehel* und *EcoRV* geschnitten und in den *Kladr1Δ* transformiert. Die für die ortsspezifische Integration benötigten homologen Bereiche sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Positionsangaben beziehen sich auf das Start-ATG (A = +1).

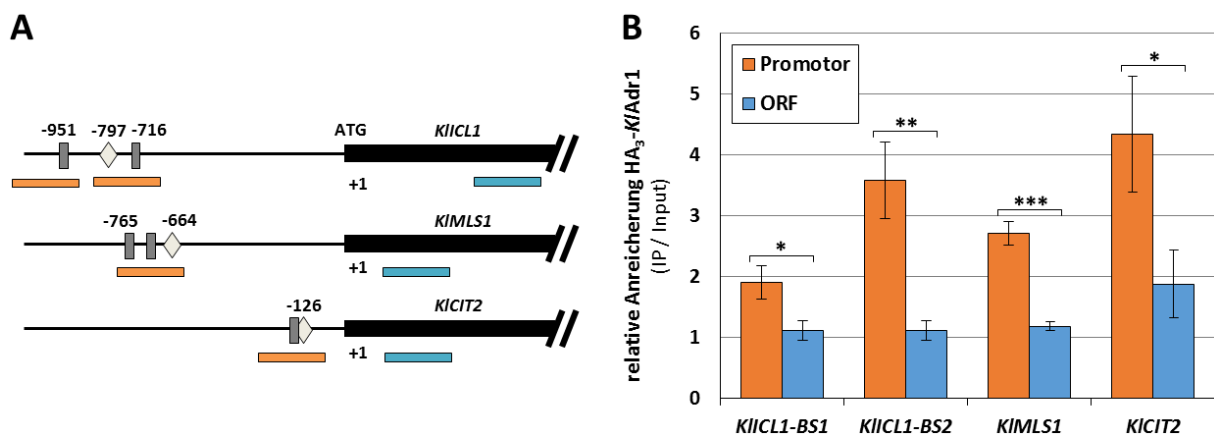
In einem zeitabhängigen Experiment wurde zunächst untersucht, zu welchem Zeitpunkt die größte Menge von  $(HA)_3$ -*KIADR1*-Transkript und  $(HA)_3$ -*KIAdr1*-Protein in der Hefezelle vorhanden ist. Dafür wurden qRT-PCR- und *Western Blot*-Analysen durchgeführt (Abbildung 22). Die Auswertung der relativen Transkriptlevel zeigt, dass die Expression von *KIADR1* bereits 30 Minuten nach einem *Shift* ansteigt, wobei der Anstieg in Glycerol höher ist als in Ethanol (6-fach bzw. 3-fach) (Abbildung 22A). In glycerolhaltigem Medium fällt das Transkriptlevel dann im weiteren Verlauf allmählich ab, wohingegen in ethanolhaltigem Medium die Expression von *KIADR1* allmählich ansteigt. In beiden C-Quellen erreicht das *KIADR1*-Transkriptlevel nach 3 bis 4 Stunden eine 3,5- (Ethanol) bis 4-fache (Glycerol) Induktion im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Die *Western Blot*-Analysen zeigen, dass bereits unter Anwesenheit von Glukose *KIAdr1*-Protein in der Zelle vorliegt (Abbildung 22B und C). In Glycerol nimmt das Proteinlevel leicht zu, ist jedoch nach 3 Stunden kaum noch detektierbar. In Ethanol nimmt die Proteinmenge von *KIAdr1* nach 30 Minuten zunächst drastisch ab, steigt dann wieder an und ist auch hier nach 3 Stunden nicht mehr detektierbar. Interessanterweise zeigt *KIAdr1* nach *Shift* in Glycerol ein verzögertes Laufverhalten im Gel, was auf eine post-translationale Modifizierung des Proteins hinweisen könnte, die es in Ethanol nicht gibt.



**Abbildung 22: Expressionsanalyse von *KIADR1* in Glycerol und Ethanol.**

*K. lactis*  $(HA)_3$ -*KIADR1* (KSY33) wurde zunächst in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase vorangezogen, in Minimalmedium mit 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt und für vier Stunden inkubiert. Zur zeitabhängigen Expressionsanalyse wurden Proben vor (0) sowie 0,5, 1, 2, 3 und 4 Stunden nach dem *Shift* entnommen. **A.** Gesamt-RNA wurde isoliert und das *KIADR1*-Transkriptlevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIALG9* im Verhältnis zum Zeitpunkt „0“. Die Messung erfolgte in technischen Triplikaten. **B.** Aus in Glycerol- bzw. **C.** aus in Ethanol-gewachsenen Zellen (von A.) wurde Gesamt-Proteinextrakt isoliert und Proteinlevel mittels *Western Blot* analysiert. 50  $\mu$ g Rohextrakt wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel aufgetrennt und  $(HA)_3$ -*KIAdr1* mit einem  $\alpha$ -HA-Antikörper detektiert.

Diese zeitabhängige Analyse verdeutlicht, dass bereits 30-60 Minuten nach Überführen in glycerolhaltiges Medium ein Maximum an *KIADR1*-Transkript- und *KIAdr1*-Proteinmenge in der Zelle vorliegt. Daher wurde für die nun folgenden ChIP-Analysen eine 30-minütige Inkubation der Zellen in Glycerol ausgewählt. Die Überprüfung einer möglichen Bindung von  $(HA)_3$ -*KIAdr1* wurde an drei Genen überprüft, deren Promotoren potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor beinhalten: *KIICL1*, *KIMLS1* und *KICIT2* (Abbildung 23A). Im Ergebnis des durchgeführten ChIP-Experiments lässt sich im Vergleich zum Input und zur als Kontrolle dienenden ORF-Sequenz am *KIICL1*-Promotor eine leichte Anreicherung an beiden *KIAdr1*-Bindestellen erkennen (Abbildung 23B), wobei die Anreicherung an Bindestelle 2 (*KIICL1*-BS2) höher ist. Auch am *KIMLS1*- und *KICIT2*-Promotor, deren Gene in *Kladr1Δ* herunter reguliert sind (siehe Tabelle 7), konnte eine Anreicherung von  $(HA)_3$ -*KIAdr1* detektiert werden.

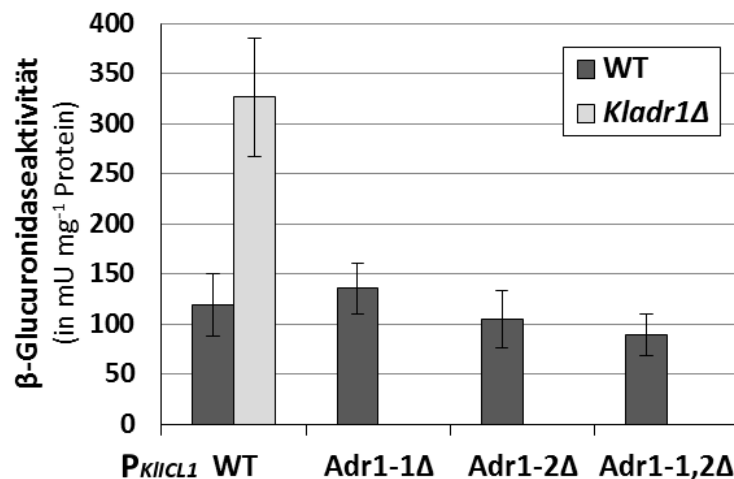


**Abbildung 23: *KIAdr1* bindet an die Promotoren von *KIICL1*, *KIMLS1* und *KICIT2*.**

**A.** Schematischer Überblick zu CSREs ( $\diamond$ , Konsensus  $CGG(N)_6GG$ ) und putativen *Adr1*-Bindestellen ( $\blacksquare$ , Konsensus  $TGGRG$ ) in Promotoren von *KIICL1*, *KIMLS1* und *KICIT2* (Positionen relativ zum Start-ATG (+1)). Angegeben sind die amplifizierte Fragmente mit Promotor- (orange Balken) und ORF-spezifischen (blaue Balken) Primern. **B.** Die Ergebnisse der ChIP-qPCR kennzeichnen die Bindung von  $(HA)_3$ -*KIAdr1* an den angegebenen Promotoren. Die Zellen (KSY33) wurden in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für 30 Minuten in Medium mit Glycerol überführt. Die relative Anreicherung in den ChIP-Proben wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* im Verhältnis zum Input berechnet. ORF-Fragmente dienten als Kontrolle der Hintergrund-Bindung. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Duplikaten. Statistische Berechnungen zur Signifikanz erfolgten mittels t-Test (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ).

### 3.2.5.2. *KlAdr1*-Bindung an $P_{KIICL1}$ ist nicht relevant für Glycerol-Repression

Ob die Bindestellen von *KlAdr1* für die in Abschnitt 3.2.3 gezeigte Repression von *KIICL1* in Glycerol verantwortlich sind, sollte durch Promotor-Deletionsanalysen überprüft werden. Für diese Untersuchungen wurden die beiden vorhergesagten 5 bp großen *KlAdr1*-Bindestellen im plasmidkodierten *KIICL1-GUS*-Reporter (Abbildung 18A) einzeln und gemeinsam deletiert und die Promotoraktivität der konstruierten Varianten im Wildtyp-Hintergrund in glycerolhaltigem Medium analysiert. Als Kontrolle diente der Wildtyp-Promotor im Wildtyp- und *Kladr1* $\Delta$ -Stamm. Sollte die Bindung von *KlAdr1* über die vorhergesagten Bindestellen im *KIICL1*-Promotor bedeutend für die Glycerol-Repression von *KIICL1* sein, würde man erwarten, dass die Deletion der Bindestellen im Wildtyp in einer vergleichbaren Promotoraktivität resultiert wie die Deletion von *KIADR1*. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass weder eine einzelne noch eine gemeinsame Deletion der *KlAdr1*-Bindestellen im Wildtyp zu einer erhöhten Promotoraktivität vergleichbar zu der des Wildtyp-Promotors in *Kladr1* $\Delta$  führt, sondern dass vielmehr das Niveau des Wildtyps beibehalten wird (Abbildung 24). *KlAdr1* kann also vermutlich an den *KIICL1*-Promotor binden, diese Bindung ist jedoch anscheinend nicht verantwortlich für die Repression von *KIICL1* in Glycerol.



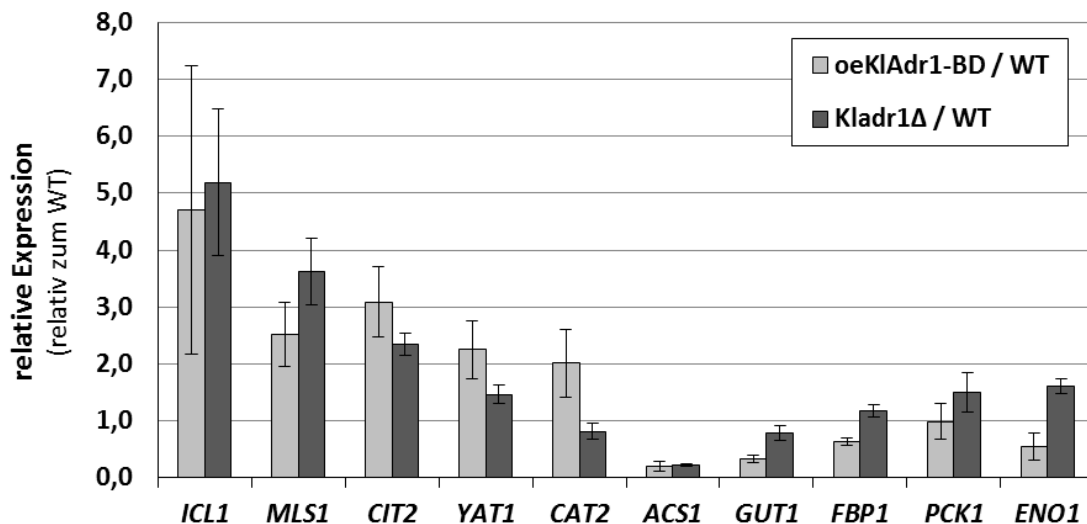
**Abbildung 24: *KlAdr1*-Bindestellen im  $P_{KIICL1}$  ist nicht nötig für Glycerol-Repression.**

Wildtyp-Zellen (JA6) wurden mit *KIICL1*-Promotorvarianten (pXY106, pXY107, pXY108) transformiert. Als Kontrolle dienten der Wildtyp-Promotor (pXY89) in Wildtyp und *Kladr1* $\Delta$  (KSY11). Die Kulturen wurden in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Minimalmedium mit 3% Glycerol überführt. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und die Promotoraktivität indirekt durch Messung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten.

### 3.2.5.3. Die Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne ähnelt einer *KIADR1*-Deletion

Überraschenderweise zeigen die vorangegangenen Deletionsanalysen, dass die *KIAdr1*-Bindestellen am *KIICL1*-Promotor anscheinend nicht wichtig für die *KIICL1*-Glycerol-Repression sind. Um zu analysieren, ob eine Bindung von *KIAdr1* überhaupt relevant ist, unabhängig davon, ob diese am *KIICL1*-Promotor oder anderswo stattfindet, wurde die Bindedomäne von *KIAdr1* (AS 18-229) im Wildtyp plasmidkodiert überexprimiert und der Glycerol-Effekt auf die *KIICL1*-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Für diese Untersuchungen wurde die *KIADR1*-Bindedomäne, angetrieben durch den nativen *KIADR1*-Promotor, in einen *multi copy*-Vektor kloniert (pXY93). Sollte die Bindung von *KIAdr1* relevant für die Glycerol-Repression von *KIICL1* sein, so würde man im Wildtyp einen deutlichen Unterschied zwischen An- und Abwesenheit der überexprimierten Bindedomäne erwarten. Wie man aus Abbildung 25 entnehmen kann, resultiert die Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne (oe*KIAdr1*-BD) tatsächlich in einer 4,7-fachen Hochregulierung des *KIICL1*-Expressionslevels und ähnelt damit dem Level von *KIICL1* im *Kladr1Δ*-Stamm (5,2-fach hochreguliert). Auch die Level anderer Transkripte, die im Glyoxylat-Zyklus wichtig sind, werden durch die Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne hochreguliert (*KIMLS1* 2,5-fach in oe*KIAdr1*-BD, 3,6-fach in *Kladr1Δ*; *KICIT2* 3-fach in oe*KIAdr1*-BD, 2,3-fach in *Kladr1Δ*). Um zu zeigen, dass es sich hierbei um keinen generellen Effekt der überexprimierten *KIAdr1*-BD handelt, wurden zudem weitere Gene analysiert, deren Expressionslevel in *Kladr1Δ* (Tabelle 7) nicht mehr als 2-fach differentiell exprimiert sind (Abbildung 25). Im Gegensatz zu den vorher aufgezählten Genen hat oe*KIAdr1*-BD entweder keinen Effekt (*KIFBP1* und *KIPCK1* in oe*KIAdr1*-BD und in *Kladr1Δ* wie WT) oder sogar einen negativen Effekt auf die Genexpression (*KIGUT1* 1,6-fach herunter reguliert in oe*KIAdr1*-BD, in *Kladr1Δ* fast wie WT; *KIENO1* 2-fach herunter reguliert in oe*KIAdr1*-BD, 1,6-fach hoch reguliert in *Kladr1Δ*).

Allem Anschein nach bewirkt eine Überexpression der *KIAdr1*-BD einen vergleichbaren, wenn auch deutlicheren Effekt, wie die Deletion von *KIADR1*. Gene, die in *Kladr1Δ* deutlich hoch- oder herunter reguliert sind, sind es auch in oe*KIAdr1* (siehe *KIICL1*, *KIMLS1* oder *KIACS1*). Für ein Gen wie *KIGUT1*, das in *Kladr1Δ* lediglich tendenziell herunter reguliert ist, wird dieser Expressionsunterschied durch die überexprimierte Bindedomäne verstärkt. Die Bindung von *KIAdr1* scheint also doch relevant für den Glycerol-Effekt von *KIICL1* zu sein. Die oe*KIAdr1*-BD verdrängt das Wildtyp-*KIAdr1* vermutlich von seinen Bindestellen und durch die fehlende Aktivierungsdomäne des Proteins wird ein *Kladr1Δ*-Effekt vermittelt.

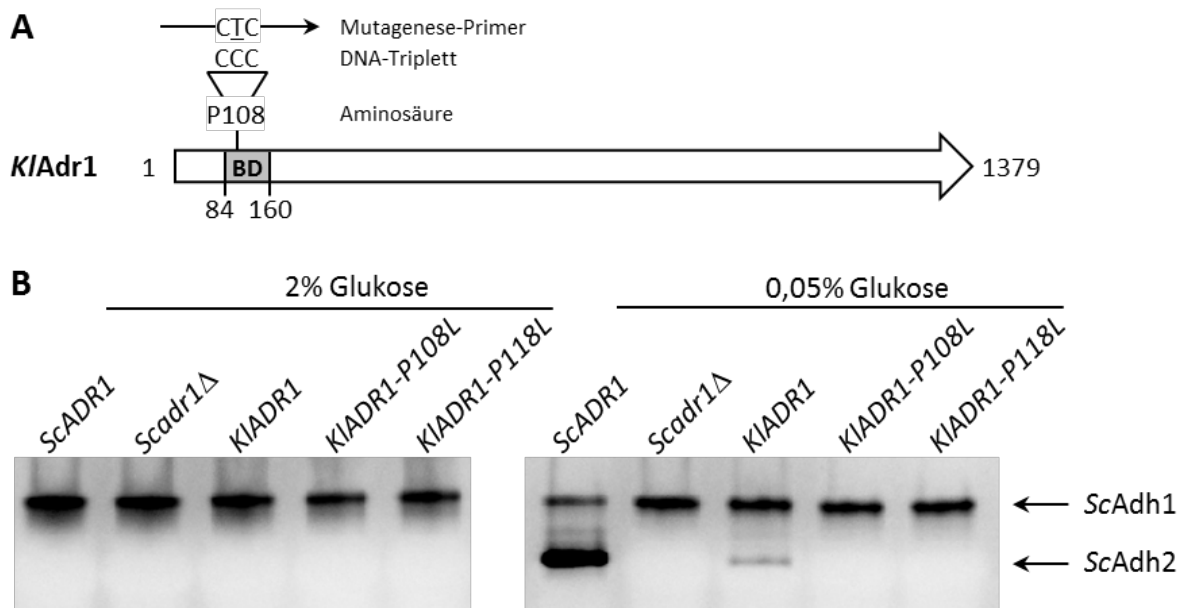


**Abbildung 25: Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne ähnelt einer *KIADR1*-Deletion.**

*K. lactis* Wildtyp-Zellen (JA6) wurden mit einem Leervektor (pTS32X) oder der *KIAdr1*-Bindedomäne (pXY93) transformiert, in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Medium mit 3% Glycerol überführt. Gesamt-RNA wurde isoliert und Genexpressionslevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression (hellgrau) erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIALG9* relativ zum WT. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Zum Vergleich wurden die jeweiligen relativen Expressionslevel (dunkelgrau) von *Kladr1Δ* im Verhältnis zum WT dargestellt (Daten siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

#### 3.2.5.4. Mutationen in der *KIAdr1*-Bindedomäne beeinflussen Bindung am *ScADH2*-, aber nicht am *KIICL1*-Promotor

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne zu artifiziellen Effekten führt, sollte in einem weiteren Ansatz gezielt die Fähigkeit von *KIAdr1*, an DNA zu binden, untersucht werden. In *S. cerevisiae* konnten bereits Mutationen identifiziert werden, durch die eine Bindung von *ScAdr1* an seine Ziel-DNA gestört ist. Diese Mutationen betreffen entweder das Zink-Finger-Motiv oder die benachbarte PAR-Region, die wichtig für eine hoch affine Bindung von *ScAdr1* an Ziel-DNA ist (Thukral *et al.*, 1991; Cook *et al.*, 1994b). Als Reporter für eine *Adr1*-Bindung dient die *ScADH2*-Expression in *S. cerevisiae*, da sowohl dessen Regulation als auch die Induktion durch *ScAdr1* in diesem Organismus gut untersucht ist. Der Nachweis einer gestörten *Adr1*-Bindung erfolgt über die Ermittlung der *ScAdh2*-Aktivität, die ein Maß für die *ScADH2*-Expression ist. Um die Bindefähigkeit von *KIAdr1* an DNA zu analysieren, wurden zwei verschiedene Mutationen innerhalb der PAR-Region eingeführt. Die DNA-Triplets, die für Prolin an Position 108 und 118 (entsprechen Prolin 87 und 97 in *ScAdr1*; Abbildung 14) kodieren, wurden durch primer-vermittelte Mutagenese in Leucin-kodierende Triplets mutiert (Abbildung 26A).



**Abbildung 26: Mutationen in der PAR-Region beeinflussen die Bindefähigkeit von *KIAdr1*.**

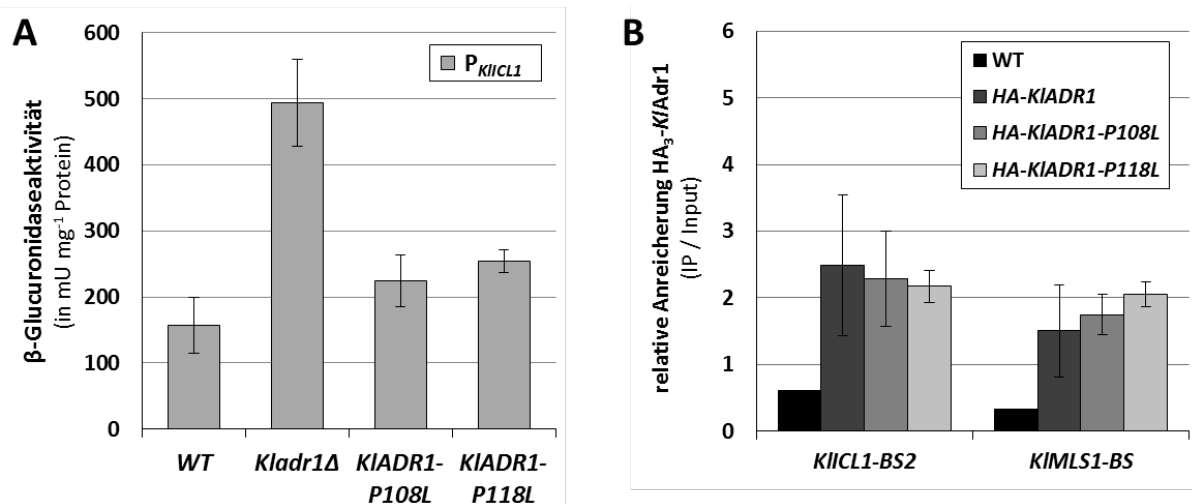
**A.** Schematische Darstellung der Primer-vermittelten Mutagenese des für Prolin 108 (P108) kodierenden DNA-Triplets zu einem Leucin-kodierenden DNA-Triplett. Die Mutagenese wurde analog für Prolin 118 durchgeführt. BD - DNA-Bindedomäne **B.** *In gel*-Färbung der Adh-Aktivitäten in *S. cerevisiae*. Wildtyp (W303-1a) und *Scadr1Δ* (CMY186) wurden mit einem Leervektor (YCplac33) und *Scadr1Δ* zudem mit dem *KIADR1* Wildtyp-Allel (pXY102), dem *KIADR1-P108L*- (pXY132) und dem *KIADR1-P118L*- (pXY133) Allel transformiert. Die Stämme wurden in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und für 6 Stunden in Medium mit 0,05% Glukose überführt. Gesamt-Proteinrohextrakt wurde isoliert und die Adh-Aktivität auf einem 5%-igen nativen PAA-Gel analysiert.

Um die DNA-Bindefähigkeit dieser Mutationen zu untersuchen, wurde das *KIADR1* Wildtyp-Allel im Plasmid pXY102 gegen die beiden mutierten Allele *KIADR1-P108L* und *KIADR1-P118L* ausgetauscht. Die daraus resultierenden Plasmide (pXY132 und pXY133) wurden in einen *Scadr1Δ*-Stamm transformiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, *ScADH2* aktivieren zu können, untersucht. Als Kontrollen dienten Wildtyp und *Scadr1Δ* sowie ein mit dem *KIADR1*-Allel transformierter *Scadr1Δ*-Stamm. Die zu untersuchenden Stämme wurden unter reprimierenden (2% Glukose) und de-reprimierenden (0,05% Glukose) Bedingungen angezogen, Proteinrohextrakt isoliert und die *ScAdh2*-Aktivität auf einem nativen PAA-Gel mit Hilfe einer *in gel*-Färbung analysiert (Abbildung 26B). Durch diese Methode kann die Alkoholdehydrogenase-Aktivität von *ScAdh1* und *ScAdh2* visualisiert werden. *ScAdh1* wird Glukose- und *Adr1*-unabhängig exprimiert (Ciriacy, 1975) und dient somit als Ladekontrolle. Wie zu erwarten war, kann für alle untersuchten Stämme in Anwesenheit von 2% Glukose keine *ScAdh2*-Aktivität nachgewiesen werden, da die *ScADH2*-Expression hier reprimiert ist (Ciriacy, 1975). Zudem wird *ScADH2* unter de-reprimierenden Bedingungen durch *ScAdr1* induziert, wobei diese Regulation durch die Deletion von *ScADR1* verloren geht (bereits

gezeigt durch Blumberg *et al.*, 1988). Durch das Einbringen des *KIADR1* Wildtyp-Allels in den *Scadr1Δ*-Stamm kann erneut ein deutliches *ScAdh2*-Signal detektiert werden, das im Vergleich zu *ScADR1* jedoch abgeschwächt ist. Durch die Mutation von *KIAdr1* an P108 bzw. P118 kann keine *ScAdh2*-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Aus diesem Ergebnis kann man schlussfolgern, dass die Mutationen in der PAR-Region anscheinend genauso wie bei *ScAdr1* zu einem Verlust der DNA-Bindefähigkeit von *KIAdr1* führen, wodurch der Transkriptionsfaktor nicht mehr wirken und *ScADH2* nicht mehr aktivieren kann.

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der PAR-Mutationen hinsichtlich des Glycerol-Repressionseffekts auf *KIICL1* untersucht werden. Dafür wurden die beiden Allele *KIADR1-P108L* und *KIADR1-P118L* ins *K. lactis*-Genom integriert. Dies wurde analog zur Stammkonstruktion von  $(HA)_3$ -*KIAdr1* unter Verwendung der Plasmide pXY125 und pXY126 durchgeführt (siehe 3.2.5.1 und Abbildung 21). Der Einfluss dieser PAR-Mutationen auf die *KIICL1*-Promotoraktivität wurde im nächsten Schritt mit Hilfe des *P<sub>KIICL1</sub>-GUS* Reporterplasmids (pXY89) analysiert (Abbildung 18A). Dieses wurde in den Wildtyp, in die *KIadr1*-Deletionsmutante und in die PAR-Mutanten  $(HA)_3$ -*KIADR1-P108L* und  $(HA)_3$ -*KIADR1-P118L* transformiert und die Promotoraktivität von *KIICL1* in glycerolhaltigem Medium analysiert (Abbildung 27A). Sollte die Fähigkeit von *KIAdr1*, an DNA zu binden, wichtig für die Glycerol-Repression des *KIICL1*-Promotors sein, würde man erwarten, dass sich die Mutationen in der PAR-Region ähnlich auswirken wie eine Deletion von *KIADR1*. Die hier getätigten Untersuchungen zeigen jedoch, dass in beiden *KIAdr1*-Mutanten eine Glycerol-Repression des *KIICL1*-Promotors vergleichbar zum Wildtyp vermittelt wird. Die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in den *KIAdr1*-PAR-Mutanten ist minimal erhöht, wobei die Erhöhung nur in *KIADR1-P118L* statistisch signifikant ist (t-Test im Vergleich zum WT:  $p$  (*KIADR1-P108L*) = 0,114,  $p$  (*KIADR1-P118L*) = 0,022). Das bedeutet entweder, dass die Bindung von *KIAdr1* nicht wichtig für die Glycerol-Repression des *KIICL1*-Promotors ist, oder dass die PAR-Mutation von *KIAdr1* in *S. cerevisiae*, aber nicht in *K. lactis*, zu einer gestörten Bindung führt. Um zu untersuchen, ob die Mutationen in der PAR-Region einen Einfluss auf die Bindung von *KIAdr1* haben, wurden ChIP-Analysen mit den Stämmen  $(HA)_3$ -*KIADR1*,  $(HA)_3$ -*KIADR1-P108L* und  $(HA)_3$ -*KIADR1-P118L* durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp ohne HA-Epitop mitgeführt.





**Abbildung 27: Kein Einfluss durch PAR-Mutationen von *KIAdr1* in *K. lactis*.**

**A.** Wildtyp (JA6), *Kladr1* $\Delta$  (KSY11),  $(HA)_3$ -*KIADR1-P108L* (KSY53) und  $(HA)_3$ -*KIADR1-P118L* (KSY54) wurden mit pXY89 transformiert. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für zwei Stunden in Minimalmedium mit 3% Glycerol überführt. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und die Promotoraktivität indirekt durch die Messung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten. **B.** Die Ergebnisse der ChIP-qPCR kennzeichnen die Bindung von  $(HA)_3$ -*KIAdr1*-Varianten an den angegebenen Promotoren relativ zum Input. Anzucht und Durchführung der ChIP von WT (JA6), *HA-KIADR1* (KSY33), *HA-KIADR1-P108L* (KSY53) und *HA-KIADR1-P118L* (KSY54) wurden wie in Abbildung 23 beschrieben durchgeführt.

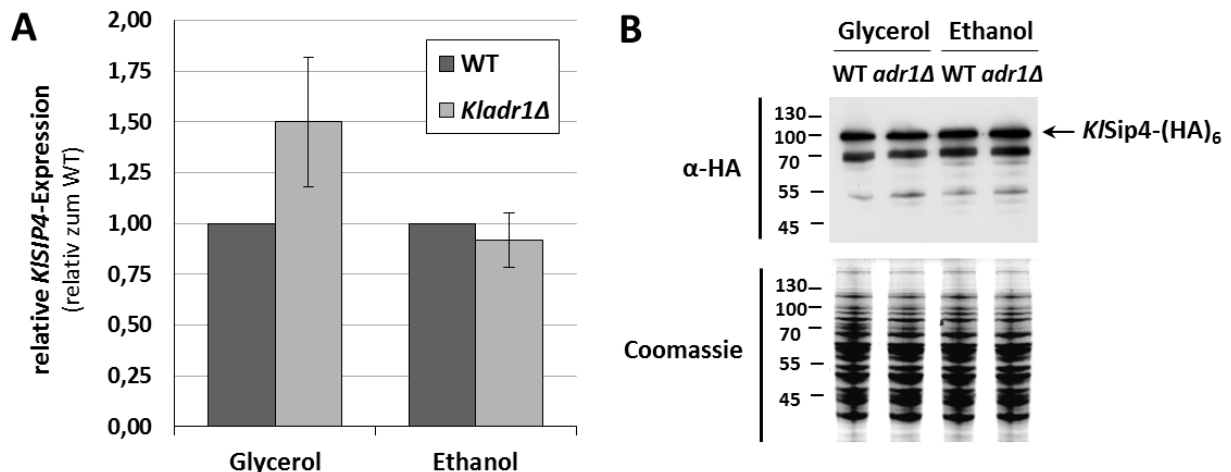
Die Auswertung der ChIP-Analysen zeigt, dass sowohl an *KIICL1-BS2* als auch an *KIMLS1-BS* eine Anreicherung der  $(HA)_3$ -*KIAdr1*-Varianten in den ChIP-Proben vergleichbar zum Wildtyp detektiert werden konnte. Im Vergleich zum nicht-epitopmarkierten Wildtyp ist die hier gemessene Anreicherung in allen drei Stämmen signifikant. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Mutationen in der PAR-Region der DNA-Bindedomäne von *KIAdr1* keinen Einfluss auf die Bindung des Proteins an den untersuchten Promotoren haben und stehen damit im Widerspruch zu den Untersuchungen in *S. cerevisiae* am *ScADH2*-Promotor.

### 3.2.6. Analysen zum Mechanismus der Co-Regulation von *KIAdr1* und *KISip4*

In mehreren unabhängigen Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Glycerol *KIAdr1* die aktivierende Funktion des Transkriptionsfaktor *KISip4* am *KIICL1*-Promotor unterdrückt. Vorstellbar wäre, dass diese Regulation I) durch die Veränderung der *KISIP4*-Transkript- oder *KISip4*-Proteinmenge, II) durch Beeinflussung der Fähigkeit von *KISip4*, an den *KIICL1*-Promotor zu binden oder III) durch Unterdrücken des *KISip4*-Aktivierungspotentials herbeigeführt wird. Diese drei Möglichkeiten sollen im Folgenden untersucht werden.

### 3.2.6.1. *KISip4*-Transkript- und Proteinlevel sind unabhängig von *KIAdr1*

Um einen ersten Einblick in die Co-Regulation von *KIAdr1* und *KISip4* zu erhalten, wurden sowohl das *KISIP4*-Transkript- als auch das *KISip4*-Proteinlevel hinsichtlich einer möglichen Abhängigkeit von *KIAdr1* untersucht. Dafür wurde eine *KISIP4*-(HA)<sub>6</sub>-Epitopmarkierung im *Kladr1Δ*-Stamm durchgeführt. Die Bestimmung der relativen *KIICL1*-Expressionslevel (Abbildung 28A) erfolgte mittels qRT-PCR und der bereits synthetisierten cDNA aus vorherigen Experimenten (Kapitel 3.2.4). Zur Analyse der Proteinlevel wurde ein Wildtyp- und *Kladr1Δ*-Stamm mit einem C-terminal HA-epitopmarkierten *KISip4* verwendet und die *KISip4*-(HA)<sub>6</sub>-Mengen in glycerol- und ethanolhaltigem Medium mittels *Western Blot* detektiert (Abbildung 28B). Die Untersuchungen zeigen, dass weder die Menge von *KISIP4* noch von *KISip4*-(HA)<sub>6</sub> von *KIAdr1* signifikant beeinflusst wird. Lediglich in Glycerol ist ein leicht erhöhtes *KISIP4*-Expressionslevel in *Kladr1Δ* im Vergleich zum Wildtyp vorhanden (Abbildung 28A), wobei der Wert aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist und mit einem R-Wert von 1,5 nicht als differentiell exprimiert bewertet werden kann.

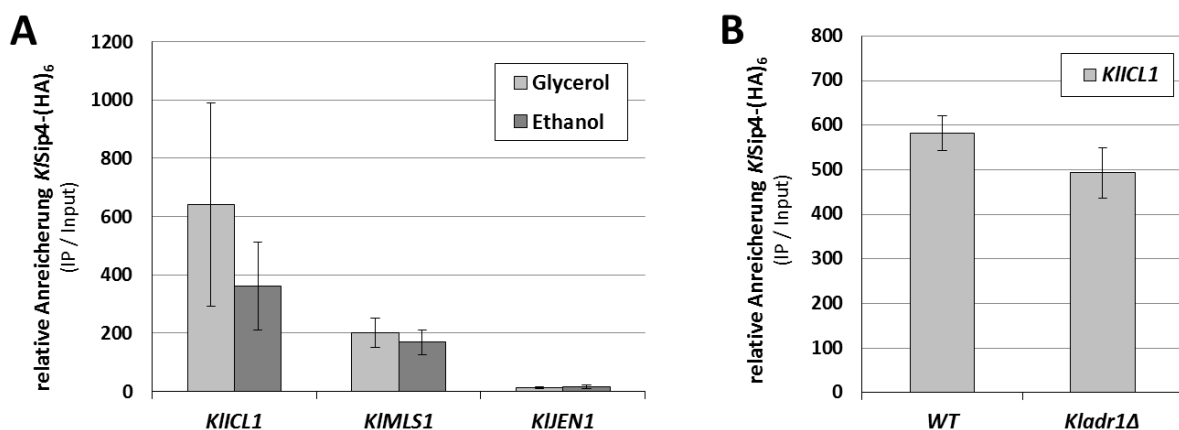


**Abbildung 28: Einfluss einer *KIADR1*-Deletion auf die *KISIP4*-Expression.**

**A.** Analyse relativer *KISIP4*-Expressionslevel mittels qRT-PCR mit Material aus Kapitel 3.2.3 (siehe Tabelle 7). Die Berechnung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* im Verhältnis zum WT. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Differentiell exprimiert, wenn  $R < 0,5$  bzw.  $R > 2,0$ . **B.** *KISip4*HA-Level im Wildtyp- (JA6/S4HA) und *Kladr1Δ*-Hintergrund (KSY31). Die Zellen wurden in Minimalmedium mit 2% Glukose vorangezogen und für drei Stunden (Mehlgarten *et al.*, 2015) in Minimalmedium mit 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und Proteinlevel mittels *Western Blot* analysiert. 25  $\mu$ g Rohextrakt wurden auf einem 12%-igen PAA-Gel aufgetrennt und *KISip4*HA mit einem  $\alpha$ -HA-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde ein gleichbehandeltes PAA-Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt.

### 3.2.6.2. Bindung von *KISip4* am *KIICL1*-Promotor wird von *KIAdr1* nicht beeinflusst

Die für *KIAdr1* und *KISip4* vorhergesagten Bindestellen im *KIICL1*-Promotor liegen relativ nah beieinander (*KIAdr1*-Bindestellen an Position -951 und -716, CSRE an Position -797 bezüglich Start-ATG, Abbildung 23A). Möglich wäre, dass die beiden Transkriptionsfaktoren um diese Bindestellen konkurrieren und *KIAdr1* in Anwesenheit von Glycerol über *KISip4* dominiert. Für *KISip4* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bindung am *KIICL1*-Promotor in Ethanol vorliegt (Mehlgarten *et al.*, 2015). Darauf basierend sollte zunächst bestätigt werden, dass *KISip4* auch in Glycerol an bereits untersuchten Promotoren bindet. Es wurden ChIP-Analysen mit einem *KISip4*(HA)<sub>6</sub>-Stamm durchgeführt und die Bindung am *KIICL1*-, *KIMLS1*- und *KIJEN1*-Promotor in Ethanol und Glycerol ermittelt. *KIJEN1* dient als negative Kontrolle, da *KISip4* an dessen Promotor nicht bindet (unveröffentlichte Daten C. Mehlgarten). Erwartungsgemäß konnte sowohl für *KIICL1* als auch für *KIMLS1*, nicht aber für *KIJEN1*, eine starke Anreicherung von *KISip4* in beiden C-Quellen detektiert werden (Abbildung 29A). In einem weiteren ChIP-Experiment sollte anschließend der Einfluss von *KIAdr1* auf die Bindung von *KISip4* am *KIICL1*-Promotor in Anwesenheit von Glycerol ermittelt werden. Die Auswertung der ChIP-qPCRs ergab, dass die Deletion von *KIADR1* keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von *KISip4* hat (Abbildung 29B). In beiden Stämmen konnte am *KIICL1*-Promotor eine starke Anreicherung von *KISip4*-(HA)<sub>6</sub> ermittelt werden.

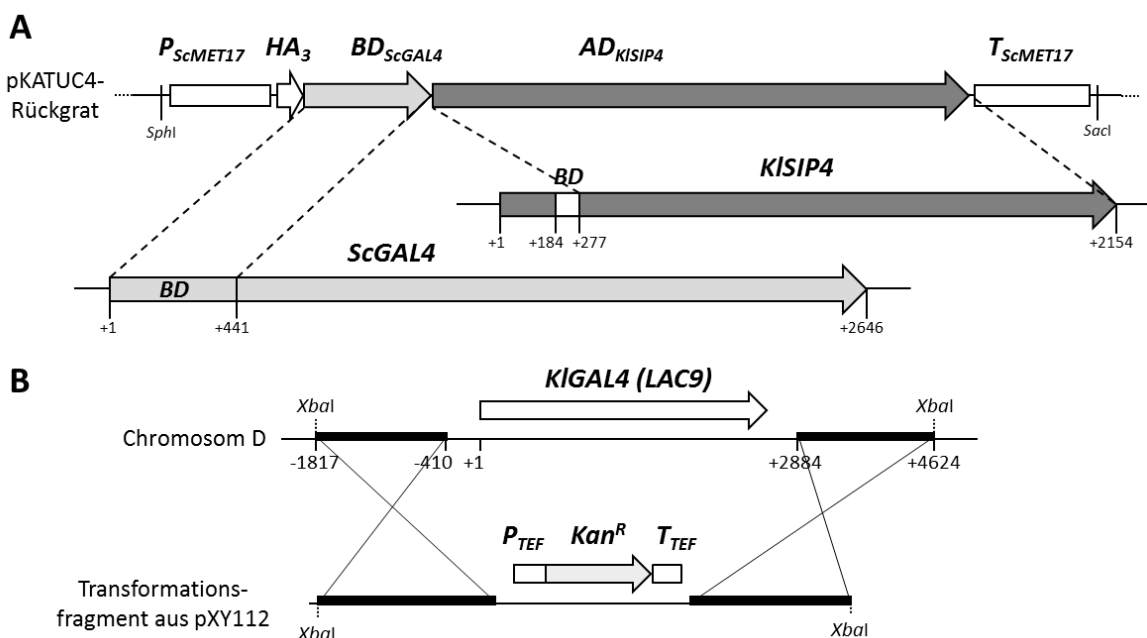


**Abbildung 29: *KISip4* bindet unabhängig von *KIAdr1* an *KIICL1*-Promotor.**

Die ChIP-qPCRs kennzeichnen die Bindung von *KISip4*-(HA)<sub>6</sub> an den angegebenen Promotoren. **A.** Die Zellen (JA6/S4HA) wurden in Minimalmedium (alle AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für drei Stunden in Minimalmedium mit 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt. **B.** Die Zellen (WT = JA6/S4HA und *Kladr1Δ* = KSY31) wurden wie in A, allerdings nur in 3% Glycerol, angezogen. Die relative Anreicherung in den ChIP-Proben wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIIPP1* im Verhältnis zum Input berechnet. Als Kontrolle der Hintergrund-Bindung dienten ORF-Fragmente, an denen keine Anreicherung detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Duplikaten.

### 3.2.6.3. Beeinflusst *K/Adr1* das *K/Sip4*-Aktivierungspotential?

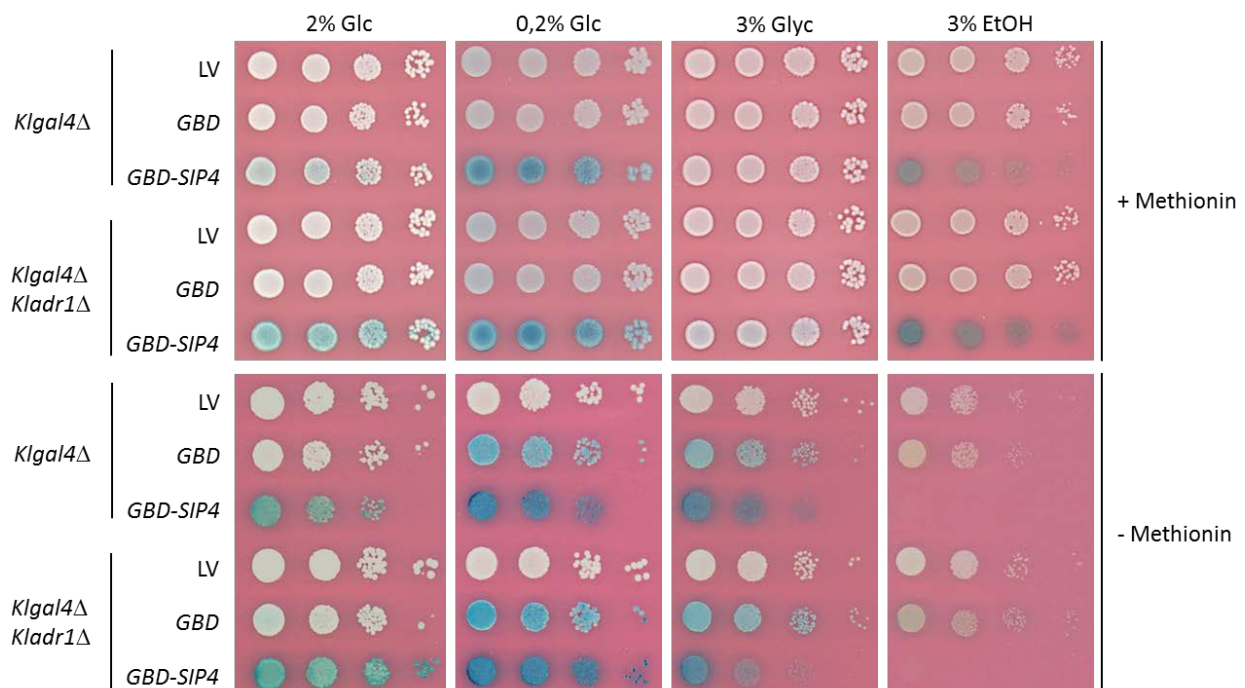
Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass *K/Adr1* weder die Transkription noch die Proteinmenge von *K/Sip4* oder dessen Bindung am *K/ICL1*-Promotor beeinflusst. Um zu überprüfen, ob die Aktivierungsfunktion von *K/Sip4* überhaupt reguliert wird und ob *K/Adr1* dabei eine Rolle spielt, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, bei dem die Bindedomäne von *ScGal4* mit der Aktivierungsdomäne von *K/Sip4* verbunden ist ( $BD_{ScGal4}$ - $AD_{K/Sip4}$ , folgend als GBD-Sip4 bezeichnet, Abbildung 30A). Da die Aktivierungsdomäne von *K/Sip4* bisher nicht näher charakterisiert ist, wurde für die Konstruktion des Fusionsproteins der gesamte C-terminale Bereich hinter der Zink-Finger-Domäne (AS 93-717) verwendet. Das Gen für dieses Fusionsprotein ist plasmid-kodiert und wird vom *ScMET17*-Promotor angetrieben, um eine moderate Transkription zu gewährleisten (Mumberg *et al.*, 1994). Mit Hilfe dieses Fusionsproteins soll untersucht werden, ob das Aktivierungspotential der *K/Sip4*-Aktivierungsdomäne durch *K/Adr1* reguliert wird. Als Reporter für das Aktivierungspotential diene hierbei die Aktivität von *LAC4*, welches vier Gal4-Bindestellen im Promotor besitzt. Die Untersuchungen erfolgten im *Kgal4Δ*-Hintergrund (Konstruktion siehe Abbildung 30B), damit die Gal4-Bindestellen im *LAC4*-Promotor nicht von *K/Gal4* besetzt sind.



**Abbildung 30: Stamm- und Plasmid-Konstruktion zu Untersuchung der *K/Sip4*-AD.**

**A.** Schematische Darstellung des konstruierten Fusionsproteins aus *ScGal4*-Binde- und *K/Sip4*-Aktivierungsdomäne, welches N-terminal mit einem  $(HA)_3$ -Epitop versehen ist. Das Gen ist flankiert vom *ScMET17*-Promotor und -Terminator und wurde über *SphI* und *SacI* in den *single copy* Vektor pKATUC4 kloniert. **B.** Schematische Darstellung des *gene replacement* von *KIGAL4* durch *KanMX* ( $P_{TEF}$ -*Kan<sup>R</sup>*- $T_{TEF}$ ). Als lineares Transformationsfragment diente das mit *XbaI* linearisierte pXY112.

Die Untersuchung zur Aktivierung von *LAC4* erfolgte zunächst phänotypisch durch die Lac4-abhängige Umsetzung des chromogenen Substrats X-Gal. Dafür wurden *Klgal4Δ* und *Kladr1Δgal4Δ*-Zellen mit dem Leervektor, der *GBD* und dem *GBD-SIP4*-Fusionskonstrukt transformiert und die Blaufärbung auf verschiedenen C-Quellen in An- und Abwesenheit von Methionin im Medium analysiert. Der *ScMET17*-Promotor ist durch Methionin reprimierbar. Durch die Zugabe von 260 μM Methionin im Medium ist die Promotoraktivität um ca. 50% reduziert (Mumberg *et al.*, 1994). Die phänotypische Analyse zeigt in erster Linie, dass das Fusionsprotein in der Lage ist, die *LAC4*-Expression zu vermitteln. Jedoch ist hinsichtlich der *GBD-SIP4*-vermittelten Blaufärbung kein Unterschied zwischen dem *Klgal4Δ*- und *Kladr1Δgal4Δ*-Stamm zu erkennen (Abbildung 31). Anhand der Blaufärbung kann man außerdem erkennen, dass auch die *GBD* allein bei mutmaßlich voller Promotoraktivität (ohne Methionin) die *LAC4*-Expression vermitteln kann. Durch die zusätzliche Fusion der *KlSip4*-Aktivierungsdomäne an die *GBD* wird das Aktivierungspotential jedoch deutlich verstärkt. Die Intensität der Blaufärbung durch *GBD* und *GBD-Sip4* ist dabei abhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle und davon, ob Methionin dem Medium zugesetzt wurde oder nicht.



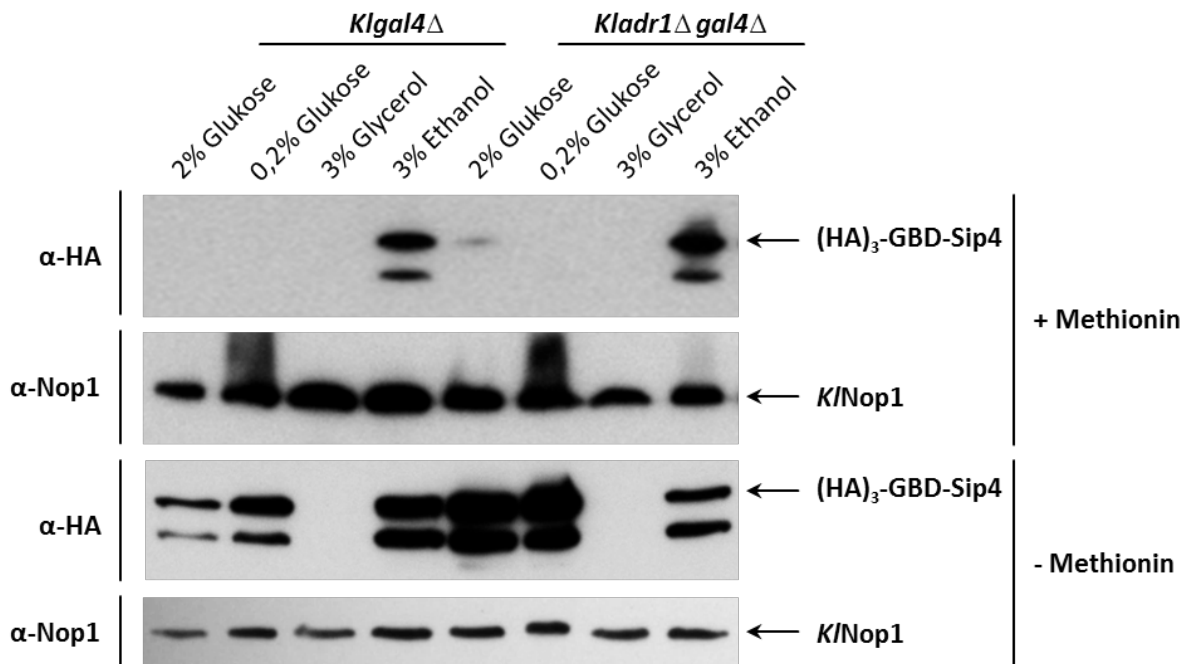
**Abbildung 31: *LAC4*-Expression durch *GBD-Sip4* ist abhängig von Kohlenstoffquelle.**

*Klgal4Δ*- (KSY43) und *Kladr1Δgal4Δ*- (KSY44) Zellen wurden mit einem Leervektor (LV, pKATUC4), der *ScGAL4-BD* (*GBD*, pXY113) und dem *GBD-SIP4*-Fusionskonstrukt (pXY114) transformiert, über Nacht in Minimalmedium ( $\text{Ura}^-$ ) mit 2% Glukose angezogen und eine serielle Verdünnung auf X-Gal-haltiges Minimalmedium ( $\text{Ura}^-$  (enthält 260 μM Methionin) bzw.  $\text{Ura}^- \text{Met}^-$ ) mit den angegebenen C-Quellen getropft. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30°C.

Die phänotypische Analyse zeigt den Erwartungen entsprechend, dass die untersuchten Stämme mit Methionin im Medium auf allen untersuchten Kohlenstoffquellen gut wachsen können, wobei die Kolonien in Ethanol etwas kleiner sind. In Abwesenheit von Methionin zeigen allerdings sowohl *Klga14Δ* als auch *Klga14Δadr1Δ*, die mit *GBD-SIP4* transformiert wurden, ein eingeschränktes Wachstum auf Glycerol sowie einen starken Wachstumsdefekt auf Ethanol. Die unterschiedlich starke *LAC4*-Expression auf den verschiedenen Kohlenstoffen kann zwei mögliche Ursachen haben: Entweder ist das Aktivierungspotential oder die Proteinmenge von *GBD-Sip4* abhängig von der Kohlenstoffquelle. Um diese Frage zu klären, wurde das *GBD-Sip4* Proteinlevel mittels *Western Blot* analysiert. In Anlehnung an vorherige *KISip4*-Experimente (Abschnitt 3.2.6.1) wurde dafür ein dreistündiger *Shift* durchgeführt.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte auch hier in An- bzw. Abwesenheit von Methionin im Medium. Anhand der durchgeführten *Western Blot*-Analysen wird deutlich, dass die  $(HA)_3$ -*GBD-Sip4*-Konzentration tatsächlich abhängig von der Kohlenstoffquelle ist (Abbildung 32). Die Deletion von *KIADR1* (*Klga14Δadr1Δ*) führt zu einem erhöhten  $(HA)_3$ -*GBD-Sip4*-Level in 2% und 0,2% Glukose sowie zu einer leichten Reduzierung in Ethanol im Vergleich zu *Klga14Δ*, wohingegen in Glycerol gar kein Fusionsprotein detektiert werden konnte. Gemäß den Erwartungen führt Methionin im Medium zudem zu einer geringeren Expression von *GBD-SIP4* als in Abwesenheit der Aminosäure, was sich in deutlich reduzierten  $(HA)_3$ -*GBD-Sip4* Proteinmengen niederschlägt. Eine einheitliche Beladung der Spuren konnte durch eine *KINop1*-Ladekontrolle verdeutlicht werden.

Das *GBD-SIP4*-Fusionskonstrukt sollte zur Untersuchung des *KISip4*-Aktivierungspotentials verwendet werden. Dabei sollte geklärt werden, ob *KIAdr1* einen Einfluss auf das Aktivierungspotential ausübt, und ob dies möglicherweise der Grund für den Glycerol-Repressionseffekt von *KIAdr1* am *KIICL1*-Promotor sein könnte. Da das Fusionskonstrukt jedoch stark von der Kohlenstoffquelle abhängig ist und sich zudem in Glycerol und Ethanol negativ auf das Wachstum auswirkt, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

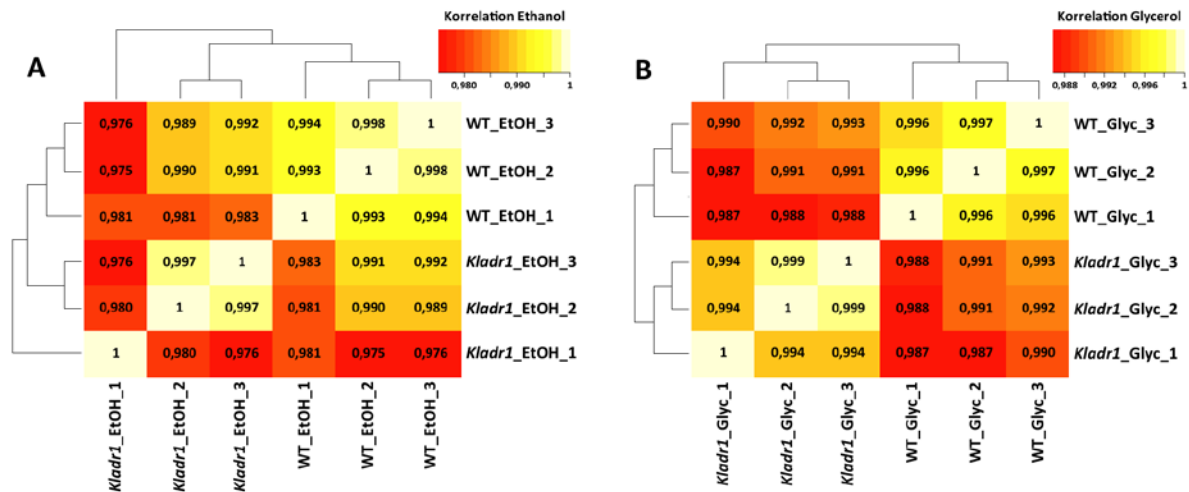


**Abbildung 32: GBD-Sip4-Proteinlevel ist abhängig von der Kohlenstoffquelle.**

Mit *GBD-SIP4* (pXY114) transformierte *Klgal4Δ*- (KSY43) und *Kladr1Δgal4Δ* (KSY44)-Zellen wurden in Minimalmedium mit (Ura<sup>-</sup>) bzw. ohne Methionin (Ura<sup>-</sup> Met<sup>-</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für drei Stunden in Medium mit 0,2% Glukose, 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamt-Proteinextrakt wurde isoliert und Proteinlevel mittels *Western Blot* analysiert. 100 µg Rohextrakt wurden auf einem 10%-igen PAA-Gel aufgetrennt und (HA)<sub>3</sub>-GBD-Sip4 mit einem α-HA-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente *K/Nop1* (α-Nop1).

### 3.2.7. Analysen zum Einfluss von *KlAdr1* bei Wachstum auf Glycerol und Ethanol

Die bisher in dieser Arbeit gewonnenen Daten geben nur wenig Aufschluss über die mögliche Bedeutung von *KlAdr1* in *K. lactis*. In phänotypischen Analysen konnte kein essentieller Zusammenhang zwischen dem TF und Kohlenstoffmetabolismus hergestellt werden (Abbildung 17). Jedoch ergab die Analyse der Expressionslevel ausgewählter Gene, dass *KlAdr1* positiv an der Regulierung des TCA/Methylcitrat-Zyklus sowie der Fettsäure-Oxidation beteiligt ist und einen negativen Einfluss auf die Expression von Genen des Glyoxylat-Zyklus hat (Tabelle 7). Um einen umfangreicheren Blick auf die Funktionen von *KlAdr1* zu bekommen, wurden wieder transkriptomweite Untersuchungen mittels *Microarrays* durchgeführt. Dafür wurde die RNA der ersten Expressionsanalysen (Kapitel 3.2.2) verwendet. Mit diesen Analysen konnte das gesamte Transkriptom von Wildtyp und *Kladr1Δ* von jeweils drei biologischen Replikaten in ethanol- bzw. glycerolhaltigem Medium miteinander verglichen werden. Der Pearson-Korrelationskoeffizient (Abbildung 33) innerhalb der biologischen Replikate eines Stammes in einer bestimmten Kohlenstoffquelle liegen nahe bei 1 und verdeutlichen, dass die biologischen Replikate untereinander keine große Variabilität der Expressionslevel aufweisen.



**Abbildung 33: Pearson-Korrelation zwischen biologischen Replikaten von WT und *Kladr1*Δ.** *Heatmap*-Diagramm einer Pearson-Korrelation zwischen den biologischen Replikaten der *Microarray*-Analyse. Geplottet sind jeweils drei biologische Replikate des Wildtyps (WT) und von *Kladr1*Δ nach Wachstum in **A.** Ethanol und **B.** Glycerol. Berechnung und Grafik von Ioana Lemnian, Institut f. Bioinformatik (MLU) (Grafik überarbeitet).

Zu beachten ist, dass Replikat 1 von *Kladr1*Δ in Ethanol (Abbildung 33A) etwas weniger den anderen beiden biologischen Replikaten gleicht (Korrelation 0,980 bzw. 0,976). Nichtsdestotrotz liegt immer noch eine sehr hohe Korrelation der drei biologischen Replikate untereinander vor. Anhand dieser Analyse wird ersichtlich, dass auch die biologischen Replikate zwischen Wildtyp und *Kladr1*Δ sehr gut miteinander korrelieren, was dafür spricht, dass es kaum Unterschiede im Transkriptom der beiden Stämme gibt. Aus diesem Grund wurde für die statistische Auswertung kein klassischer t-Test, sondern ein *Shrinkage*-t-Test durchgeführt (Opgen-Rhein und Strimmer, 2007). Der Unterschied dieser beiden Tests liegt in der Schätzung der Varianz, die für die Berechnung der Signifikanz benötigt wird. Während beim klassischen t-Test davon ausgegangen wird, dass die zu vergleichenden Variablen normalverteilt sind und die Varianz gleich ist, wird beim *Shrinkage*-t-Test keine Annahme über die Verteilung der Variablen gemacht und für die Varianz ein sogenannter „*shrinkage estimator*“ verwendet, bei dem die Daten aller Gene eingehen. Das bedeutet, dass bei dieser Methode die Varianz der Expression eines Gens von den Varianzen aller Gene abhängt.

Die Auswertung der Transkriptomdaten erfolgte analog wie in Kapitel 3.1 beschrieben. Anhand von *Volcano Plots*, die relative Expressionslevel den jeweiligen Signifikanzniveaus gegenüber stellen, wird ersichtlich, dass tatsächlich kaum Veränderungen des Transkriptoms durch die Deletion von *KIADR1* herbeigeführt werden (Abbildung 34). Im *Kladr1*Δ-Stamm sind im Vergleich zum Wildtyp in Ethanol nur 23 Gene und in Glycerol 43 Gene signifikant differentiell exprimiert. Eine Übersicht aller DEGs befindet sich im Anhang (Tabelle A10).





**Abbildung 34: *Kladr1*Δ zeigt kaum Veränderungen im Transkriptom bei Wachstum auf Ethanol oder Glycerol.**

*Vulcano Plot* zur visuellen Darstellung von Veränderungen im Genexpressionslevel des *K. lactis* Transkriptoms zwischen Wildtyp und *Kladr1*Δ nach zweistündigem Wachstum in **A.** 3% Ethanol bzw. **B.** 3% Glycerol. Geplottet ist das Signifikanzniveau ( $-\log_{10}$  adjusted p-value) gegen relative Expressionslevel ( $\log_2$  fold change (FC)) von *Kladr1*Δ relativ zum Wildtyp. Als signifikant gilt:  $p \leq 0,05$  (also  $-\log_{10} \geq 1,3$ ) und als differentiell exprimiert gilt:  $FC \leq 0,5$  und  $FC \geq 2,0$  (bzw.  $\log_2 FC \leq -1$  und  $\log_2 FC \geq 1$ ). Blau gekennzeichnet sind alle Datenpunkte, die in *Kladr1*Δ im Vergleich zum WT in Ethanol bzw. Glycerol signifikant hoch- bzw. herunter reguliert sind. Berechnung und Grafik von Ioana Lemnian, Institut f. Bioinformatik (MLU) (Grafik überarbeitet).

In Ethanol können 10 von 12 Genen, die herunter reguliert werden, der Kategorie „Kohlenstoffmetabolismus“ zugeordnet werden, was einer signifikanten Anreicherung entspricht (korrigierter p-Wert = 0,022). Dazu zählt *KIADR1* an sich, das allerdings nur ein 3-fach erniedrigtes Expressionslevel im Vergleich zum WT aufweist. Da im *Kladr1*Δ-Stamm das *KIADR1*-Gen nicht komplett deletiert sondern nur der ORF durch die Insertion einer Selektionskassette disruptiert wurde (Abbildung 16), liegen in der Zelle wahrscheinlich noch verkürzte *KIADR1*-Transkripte vor, die in den *Microarrays* detektiert werden. Des Weiteren zählen zu DEGs mit reduziertem Expressionslevel die zum TCA- bzw. Methylcitrat-Zyklus gehörenden Gene *KICIT3* und *KIICL2* (5-fach bzw. 50-fach herunter reguliert), zwei Gene der Fettsäure-Oxidation (*KIFOX2* und *KIPOX1* jeweils 2-fach erniedrigt) sowie zwei Gene, deren Funktion für Kohlenstofftransport annotiert ist (*KLLAOE11881g* 3-fach und *KLLAOE25015g* 5-fach erniedrigt). Ein weiteres Gen, *KLLAOB00264g*, das für eine Maltose-Permease kodiert, zeigt ebenfalls ein verringertes Expressionslevel, gehört aber laut MIPS-Kategorisierung nicht zum Kohlenstoffmetabolismus. Im Gegensatz dazu gehören die Gene, die im *Kladr1*Δ-Stamm

in Ethanol ein erhöhtes Expressionslevel zeigen, zu den Kategorien Transkription, DNA-Prozessierung und Zellzyklus. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass genau diese Prozesse durch einen *Shift* von Glukose auf Ethanol im Wildtyp herunter reguliert werden (siehe Kapitel 3.1.1 sowie Abbildung 10 und Abbildung 11). Man kann daher annehmen, dass *KlAdr1* als negativer Regulator daran beteiligt ist.

In Glycerol werden durch eine *KIADR1*-Deletion 34 Gene herunter und 9 Gene hoch reguliert. Auch hier liegt eine signifikante Anreicherung von Genen mit verringerter Expression in der Kategorie „Kohlenstoffmetabolismus“ (korrigierter p-Wert = 0,041). Abgesehen von drei Genen werden alle Gene, die in Ethanol im *Kladr1Δ*-Stamm eine verringerte Expression aufweisen, auch in Glycerol durch Fehlen des Transkriptionsfaktors herunter reguliert. Zwei dieser Ausnahmen, *KIICL2* und *KIFOX2*, verfehlen nur knapp den Status als DEG, da sie weniger als 2-fach herunter reguliert sind (*KIICL2* 1,5-fach, *KIFOX2* 1,7-fach). Zusätzlich in Glycerol herunter reguliert werden *KIMAE1*, das für ein Malatenzym kodiert und die Synthese von Malat zu Pyruvat katalysiert (2,3-fach reduziert), *KITMT1*, das für eine trans-Aconitat-Methyltransferase kodiert (3,3-fach vermindert) und *KIPKP1*, das als Homolog von *ScPKP1* annotiert ist (1,9-fach herunter reguliert). *ScPkp1* ist eine Proteinkinase, die in *S. cerevisiae* an der negativen Regulierung des PDH-Komplexes beteiligt ist (Krause-Buchholz *et al.*, 2006). Außerdem gibt es drei potentielle Kohlenstofftransporter, die ebenfalls herunter reguliert werden. Dabei handelt es sich um die bereits erwähnte Maltose-Permease (*KLLA0B00264g*), das für einen putativen Urea- und Polyamin-Transporter kodierende *KLLA0C17468g* (annotiertes Homolog zu *ScDUR3*) sowie *KLLA0B02607g* (putativer Fettsäure-Transporter). Auffällig ist zudem eine Häufung von Genen, die in Glycerol in *Kladr1Δ* herunter reguliert und mit Fettsäure- und Aminosäure-Stoffwechsel assoziiert sind (z.B. *KIANT1* und *KISPS19* bzw. *KLLA0A04906g* und *KLLA0F13640g*). Neben diesen metabolischen Genen sind zudem einzelne Gene, die ganz verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet werden können, herunter reguliert. Dazu zählen z.B. Zellzyklus (*KIFAR1* 1,8-fach reduziert), *Mating* (*KISTE4* 3,3-fach reduziert) oder Erhalt der Peroxisomen (*KIPEX25* 2,1-fach reduziert).

Aufgrund der Deletion von *KIADR1* werden in Glycerol außerdem neun Gene hoch reguliert. Hierbei handelt es sich allerdings funktionell um völlig andere Kategorien als in Ethanol. Wieder gehören fünf der Gene, die in Glycerol ein gesteigertes Expressionslevel aufweisen, dem Kohlenstoffmetabolismus an. Dabei handelt es sich zum einen um zwei Gene der Biotin-Synthese (*KIBIO3* 2,6-fach, *KIBIO4* 3,6-fach gesteigert). In *K. lactis* scheint zumindest auf

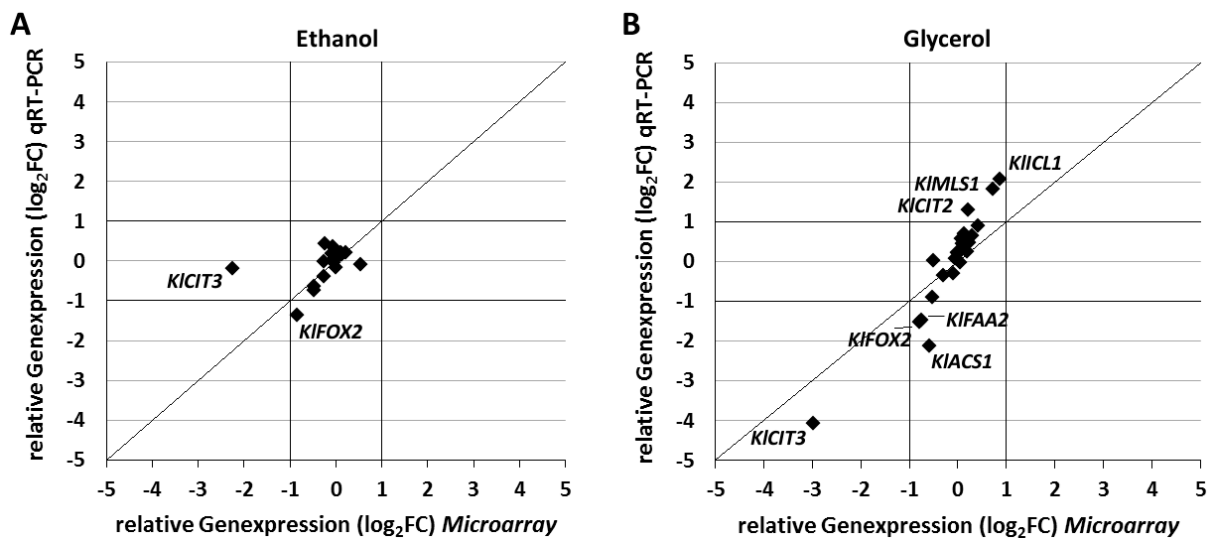
Glycerol *KIAdr1* einen reprimierenden Effekt auf die Genexpression von *KIBIO3* und *KIBIO4*, nicht aber auf *KIBIO5*, auszuüben. Zum anderen werden *KLLA0B11363g* und *KLLA0F09141g*, die für eine 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFK-2) bzw. eine Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodieren, sowie *KLLA0A06468g*, dessen Genprodukt an der Assemblierung von  $\beta$ -Glucan beteiligt ist, in *Kladr1 $\Delta$*  induziert. GAPDHs katalysieren die Reaktion von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat und damit einen wichtigen Schritt der Glykolyse und Gluconeogenese. PFK-2 vermittelt die Umsetzung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-2,6-Bisphosphat, das als allosterischer Regulator der Phosphofruktokinase wirkt (Avigad, 1981). Daher deuten die hier erhobenen Daten auf eine Funktion von *KIAdr1* in der Glykolyse bzw. Gluconeogenese hin. Die anderen fünf Gene, die in Glycerol hoch reguliert werden, gehören zu sehr verschiedenen zellulären Prozessen wie Siderophore-Transport (*KLLA0A04367g* 2,7-fach induziert), Zellwandbildung (*KIOSW5* 2,2-fach, *KIKRE9* 2,4-fach induziert) und Rekombination (*KIREC104* 2,9-fach induziert) oder haben unbekannte Funktion (*KLLA0F08745g* 2-fach induziert).

Sowohl in Ethanol als auch in Glycerol werden einige Gene durch *KIAdr1* gleichermaßen positiv reguliert. Das spricht für einen generellen Einfluss des Transkriptionsfaktors aufgrund des Glukosemangels, um die Verwertung alternativer Kohlenstoffe via Fettsäure-Oxidation und Methylcitrat-Zyklus zu ermöglichen. In Glycerol werden jedoch mehr Gene dieser Stoffwechselwege durch *KIAdr1* induziert. *KIAdr1* hat zudem weitere, kohlenstoffquellenabhängige Funktionen. In Ethanol ist *KIAdr1* an der Regulation einiger Gene der Translationsmaschinerie beteiligt, die während der Adaption an Wachstum auf Ethanol heruntergefahren wird. In Glycerol hingegen hat *KIAdr1* einen weiteren Einfluss auf regulatorische Stellschrauben des Kohlenstoffmetabolismus, auf ein paar Gene des Aminosäuremetabolismus und der Biotin-Biosynthese sowie auf einzelne Gene, die den unterschiedlichsten zellulären Prozessen und Kompartimenten zugeordnet werden.

### **3.2.8. Gegenüberstellung von *Microarray*- und qRT-PCR-Expressionsdaten**

Nach Auswertung der *Microarray*-Daten im *Kladr1 $\Delta$* -Stamm fällt auf, dass viele der Gene, die in den zuvor getätigten Expressionsanalysen per qRT-PCR (Tabelle 7 und Tabelle 8) eine differentielle Genexpression zeigten, in den transkriptomweiten Untersuchungen nicht als DEGs auftauchen. Ein Vergleich der jeweiligen Expressionswerte dieser 24 Gene ist in Abbildung 35 dargestellt. Sollte eine hohe Korrelation der Werte vorliegen, würde man eine

Häufung der Datenpunkte entlang der im Diagramm eingezeichneten diagonalen Linie, die einer Korrelation von  $R = 1$  entspricht, erwarten. Dies trifft hauptsächlich für die Gene, die in beiden Analysen nicht differentiell exprimiert sind, zu. Gene, die in beiden Analysen ein reduziertes bzw. gesteigertes Expressionsniveau aufweisen, würde man in Abbildung 35 im unteren linken Quadranten (Q IV) bzw. im oberen rechten Quadranten (Q II) erwarten. Doch genau das ist nicht der Fall. Man kann für die Datenpunkte in Glycerol deutlich erkennen, dass je höher oder niedriger die Expressionslevel in der qRT-PCR waren, umso weniger gut korrelieren diese Werte mit denen aus der *Microarray*-Analyse (Abbildung 35B). Eine Ausnahme stellt dabei *KICIT3* dar, das in beiden Berechnungen deutlich herunter reguliert ist. Auch in Ethanol korrelieren die Werte nicht gut miteinander. So ist *KICIT3* im *Array*, nicht aber in den qRT-PCRs, herunter reguliert und bei *KIFOX2* *vice versa* (Abbildung 35A). Ursächlich für den unterschiedlichen Aussagegehalt der Expressionsdaten, die aus derselben RNA gewonnen wurden, ist vermutlich die Art der Normierung bei der Berechnung der Expressionslevel. Während bei den qRT-PCR-Analysen die Normierung mit Hilfe eines Referenzgens erfolgt, geschah dies in den *Microarray*-Analysen über eine RMA-Normalisierung.



**Abbildung 35: Vergleich der Expressionsdaten aus *Microarray* und qRT-PCR in *Kladr1Δ*.**

*Scatter Plot* zur vergleichenden Darstellung der relativen Expressionslevel ( $\log_2FC$ ) aller Gene, die sowohl durch qRT-PCR (Tabelle 7 und Tabelle 8) als auch durch *Microarray*-Analyse (Tabelle A9) errechnet wurden. Abgebildet sind relative Expressionswerte von 24 Genen im Verhältnis von *Kladr1Δ* zum Wildtyp in **A**. Ethanol und **B**. Glycerol. Differentiell exprimiert ist ein Gen, wenn der  $FC \leq 0,5$  bzw.  $\geq 2$ , also der  $\log_2FC \leq -1$  bzw.  $\geq +1$  (horizontale und vertikale Linie) ist. Die Linie durch den Koordinatenursprung repräsentiert eine theoretische Korrelation von 1. Q I bis Q IV kennzeichnen die Quadranten, in die der *Scatter Plot* eingeteilt werden kann. Gene, die in beiden Analysen gleichermaßen reguliert werden, befinden sich in Q II und Q IV, wohingegen Gene, die gegensätzlich reguliert werden, in Q I und Q III anzutreffen sind.

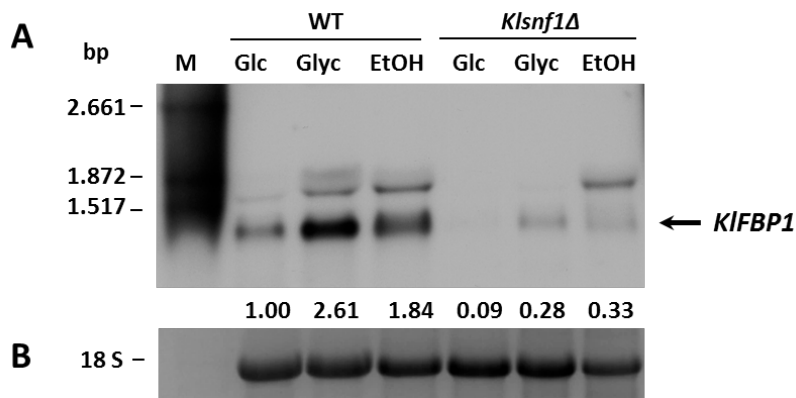
### 3.3. Analysen zur transkriptionellen Regulation von *KIFBP1*

Die durch das Gen *FBP1* kodierte Fructose-1,6-bisphosphatase ist ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, das die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe ermöglicht. In *S. cerevisiae* wird die Transkription von *ScFBP1* vom *ScSnf1*-Komplex gesteuert und direkt durch *ScMig1*, *ScCat8* und dem aktivierenden HAP-Komplex reguliert (siehe Kapitel 1.6). Auch in *K. lactis* ist die Transkription von *KIFBP1* vom *KISnf1*-Komplex abhängig (persönliche Mitteilung C. Mehlgarten), nicht jedoch von *KICat8* oder *KISip4* (Mehlgarten *et al.*, 2015). Dieser Teil der Arbeit befasst sich daher mit einer näheren Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung von *KIFBP1* hinsichtlich möglicher *cis*-regulatorischer Elemente und *in trans* wirkender Faktoren, die die Regulation der *KIFBP1*-Expression durch den *KISnf1*-Proteinkomplex vermitteln.

#### 3.3.1. *KIFBP1*-Expression wird durch nicht-fermentierbare C-Quellen induziert

Um einen Einblick in die Regulation von *KIFBP1* zu gewinnen, wurde zunächst die Transkriptmenge des gluconeogenischen Gens hinsichtlich einer Induktion unter nicht-reprimierenden Wachstumsbedingungen untersucht. Da bereits bekannt ist, dass eine Deletion von *KISNF1* einen negativen Einfluss auf die *KIFBP1*-Expression hat (RNA-Seq Analysen C. Mehlgarten, unveröffentlichte Daten), wurde das *KIFBP1*-Transkriptlevel vergleichend zwischen Wildtyp und *Klsnf1* $\Delta$  analysiert.

Hierfür wurde der *K. lactis* Wildtypstamm JA6 und die *Klsnf1*-Deletionsmutante unter reprimierenden (2% Glukose) und nicht-reprimierenden (3% Glycerol bzw. 3% Ethanol) Bedingungen angezogen und die *KIFBP1*-Transkriptmenge über *Northern Blot* und mittels einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen *KIFBP1* analysiert (Abbildung 36). Bereits unter reprimierenden Bedingungen zeigt sich im Wildtyp eine basale Expression von *KIFBP1*, die in Anwesenheit von nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen ansteigt, wobei in Glycerol eine starke Induktion (2,6-fach) des mRNA-Levels auftritt als in Ethanol (1,8-fach). In den in dieser Arbeit durchgeführten *Microarray*-Analysen des Wildtyps konnte allerdings lediglich eine 1,4- bzw. 1,6-fach Induktion der *KIFBP1*-Expression in Glycerol bzw. Ethanol beobachtet werden. Die *Northern Blot*-Analyse zeigt zudem, dass die *KIFBP1*-Expression sowohl unter reprimierenden als auch unter induzierenden Bedingungen im *Klsnf1* $\Delta$ -Stamm stark reduziert ist.



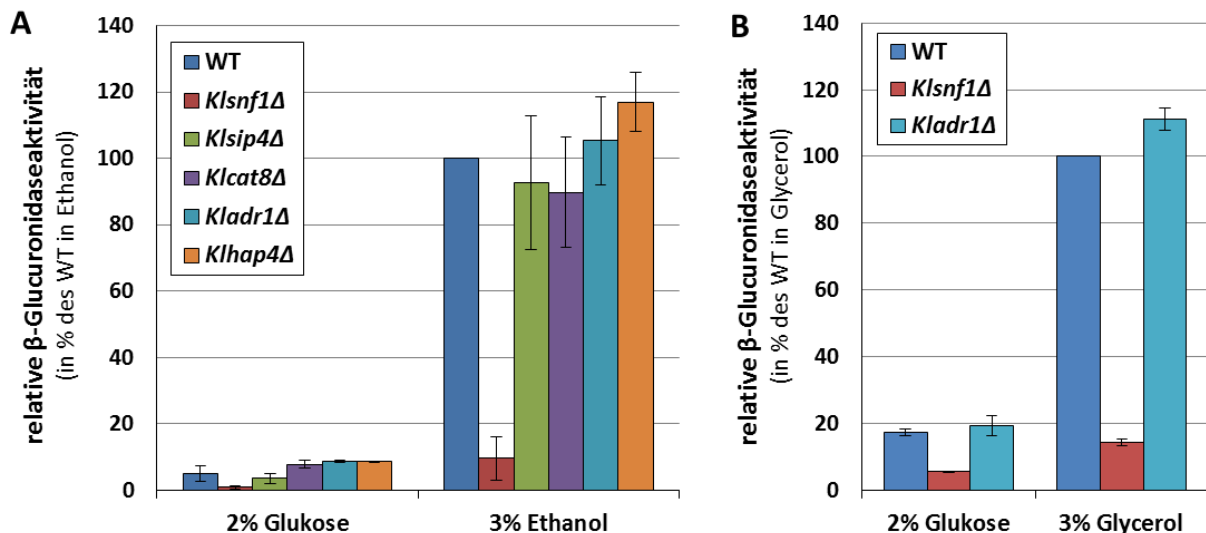
**Abbildung 36: Die Induktion von *KIFBP1* ist abhängig von *KISnf1* und der C-Quelle.**

Der Wildtyp (JA6) und *Klsnf1Δ* (JSD1) wurden in Minimalmedium (AS/B) mit 2% Glukose vorangezogen und für 1 h in Minimalmedium (AS/B) mit 3% Glycerol bzw. 3% Ethanol überführt. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert. **A.** Northern Blot-Analyse mit jeweils 5 µg RNA. Die Detektion erfolgte mittels DIG-markierter *KIFBP1*-DNA-Sonde. **B.** Die aufgetrennte rRNA im Formaldehydgel dient als Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit ImageJ, wobei die Werte ins Verhältnis zur 18S rRNA der Ladekontrolle (B) gesetzt wurden. Die Zahlen repräsentieren die Expressionswerte relativ zum Wildtyp in Glukose normiert auf die Ladekontrolle. Marker (M): RNA molecular weight marker II, digoxigenin-labeled (Roche).

### 3.3.2. Transkriptionelle *ScFBP1*-Regulation ist nicht übertragbar auf *KIFBP1*

Aus *S. cerevisiae* sind bereits einige transkriptionelle Regulatoren der *ScFBP1*-Expression bekannt. Dazu gehören neben *ScSnf1* u.a. auch *ScCat8*, *ScSip4*, *ScAdr1* und der HAP-Komplex (siehe Kapitel 1.6). Um zu überprüfen, ob diese Faktoren auch in *K. lactis* an der Regulation der *KIFBP1*-Expression beteiligt sind, wurden Reporter-gen-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde ein 1000 bp langes Fragment des *KIFBP1*-Promotors (1000 bis 1 bp *upstream* des Start-ATG) vor das *GUS*-Gen fusioniert und in einen *multicopy*-Vektor kloniert (pXY20), um auch kleine Aktivitätsunterschiede detektieren zu können. Die Promotoraktivität wurde sowohl im Wildtyp als auch in den Deletionsstämmen *Klsnf1Δ*, *Klcat8Δ*, *Klsip4Δ*, *Kladr1Δ* und *Klhap4Δ* unter reprimierenden und induzierenden Bedingungen untersucht (Abbildung 37A).

Die Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität zeigt, dass die Promotoraktivität im Wildtyp in Ethanol im Vergleich zu Glukose bis zu 20-fach gesteigert ist. Der Wert der Aktivität in Ethanol im Wildtyp wurde gleich 100% gesetzt. Die Deletion von *KISNF1* führt zu einer reduzierten Transkriptionsaktivierung des *KIFBP1*-Promotors in Glukose und Ethanol um 80% bzw. 90%. Jedoch führt weder die Deletion der Transkriptionsfaktoren *KISip4* und *KICat8* noch von *KIAdr1* oder *KIHap4* zu einer deutlichen Reduzierung der Promotoraktivität. Daher ist es wahrscheinlich, dass die transkriptionelle Aktivierung von *FBP1* in den beiden Hefespezies *K. lactis* und *S. cerevisiae* unterschiedlich reguliert wird.



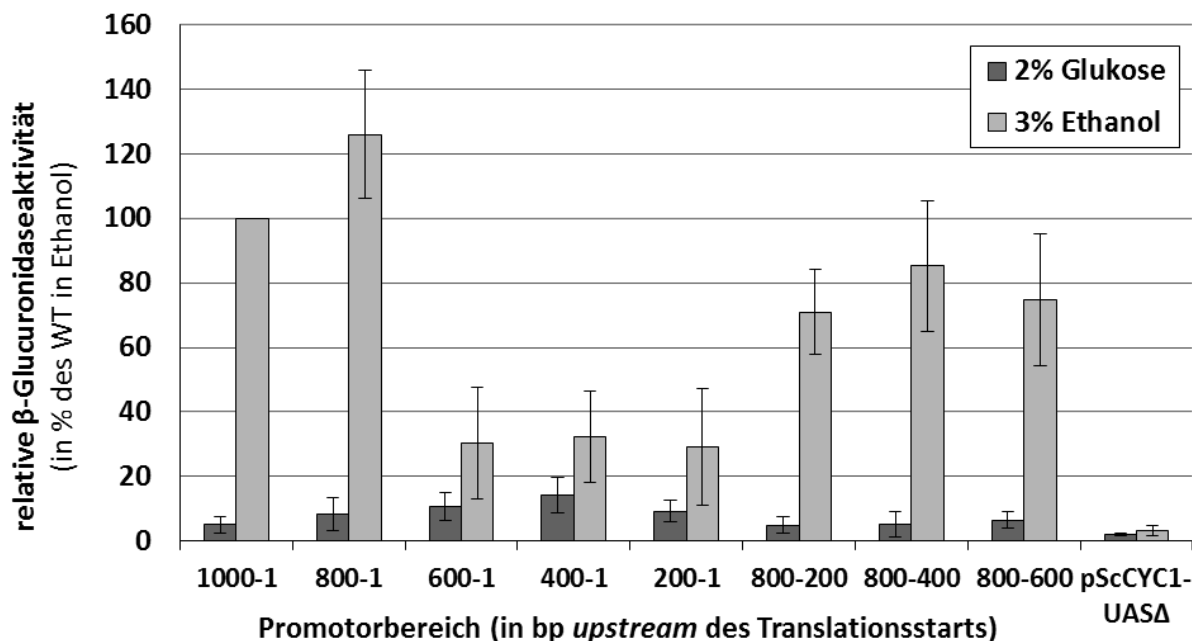
**Abbildung 37: Transkriptionelle Regulation des *KIFBP1*-Promotors erfolgt unabhängig von aus *S. cerevisiae* bekannten Transkriptionsfaktoren.**

**A.** Die Stämme JA6, *Klsnf1ΔR* (JSD1R), *Klsip4Δ* (JA6/DS4), *Klcat8Δ* (yIG8), *Kladr1ΔR* (KSY13) und *Klhap4ΔR* (KSY12) wurden mit dem Plasmid pXY20 transformiert, über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen und je 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten für 4 h in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamtproteinextrakt wurde isoliert und die *KIFBP1*-Promotoraktivität indirekt durch die Aktivität der β-Glucuronidase bestimmt. Dargestellt ist die relative β-Glucuronidaseaktivität im Verhältnis zum Wildtyp in Ethanol. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten. **B.** Mit pXY20 transformierte JA6, *Klsnf1ΔR* (JSD1R) und *Kladr1ΔR* (KSY13) Zellen wurden genauso wie in A angezogen und in Minimalmedium mit 2% Glukose bzw. 3% Glycerol überführt. Die Standardabweichung errechnet sich aus zwei technischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten.

Zahlreiche Untersuchungen im vorausgegangenen Teil dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass die Rolle von *KlAdr1* in Glycerol größer ist als in Ethanol. Obwohl in den *Microarrays* mit *Kladr1Δ* kein Einfluss auf die *KIFBP1*-Expression festgestellt werden konnte (Tabelle A10), wurde in einem weiteren Experiment die Promotoraktivität von *KIFBP1* in Glycerol in Abhängigkeit von *KlAdr1* untersucht. pXY20 wurde dafür wieder in JA6, *Kladr1Δ* und zur Kontrolle in *Klsnf1Δ* transformiert und die β-Glucuronidaseaktivität in 2% Glukose und 3% Glycerol analysiert (Abbildung 37B). Betrachtet man zunächst den Wildtyp im Vergleich zum vorherigen Versuch (Anzucht in 3% Ethanol, Abbildung 37A) wird deutlich, dass durch Glycerol die Promotoraktivität nur um das 5-fache gesteigert wird (in Ethanol um das 20-fache). Da die dargestellten Werte auf den Wildtyp in der alternativen C-Quelle normiert wurden, erscheint die Promotoraktivität bei 2% Glukose in Abbildung 37B höher. Die absoluten Werte waren aber bei beiden Ansätzen ähnlich. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt *Klsnf1Δ* eine Reduzierung der Promotoraktivität in 3% Glycerol um 80%. Für *Kladr1Δ* ist jedoch auch hier kein deutlicher Einfluss der Deletion auf die *KIFBP1*-Promotoraktivität zu verzeichnen.

### 3.3.3. Identifizierung *cis*-regulatorischer Bereiche des *KIFBP1*-Promotors

Die transkriptionelle Regulation des *KIFBP1*-Promotors wird anscheinend von einem bisher unbekanntem Transkriptionsaktivator beeinflusst. Daher sollte im weiteren Verlauf der für die transkriptionelle Aktivierung mindestens benötigte Bereich identifiziert werden. Hierfür wurde der Promotor sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende aus verkürzt und die entstandenen Promotor-*GUS*-Fusionskonstrukte auf ihre Fähigkeit, den Promotor zu aktivieren, untersucht (Abbildung 38). Da eine 3'-Verkürzung zum Verlust des endogenen *core* Promotors führt, werden diese Fragmente von dem *ScCYC1 core*-Promotor flankiert (Abbildung A2). Die verschiedenen Promotor-*GUS*-Varianten wurden in den Wildtyp transformiert und die Induzierbarkeit des Promotors erneut über die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in Anwesenheit von Glukose und Ethanol bestimmt. Die Messungen zeigen, dass eine Verkürzung des Promotors um 200 bp am 5'-Ende zu einer Erhöhung der Promotoraktivität in Ethanol um durchschnittlich 20% führt; weitere Verkürzungen des 5'-Endes resultieren jedoch in einer drastischen Reduzierung der Aktivierbarkeit.



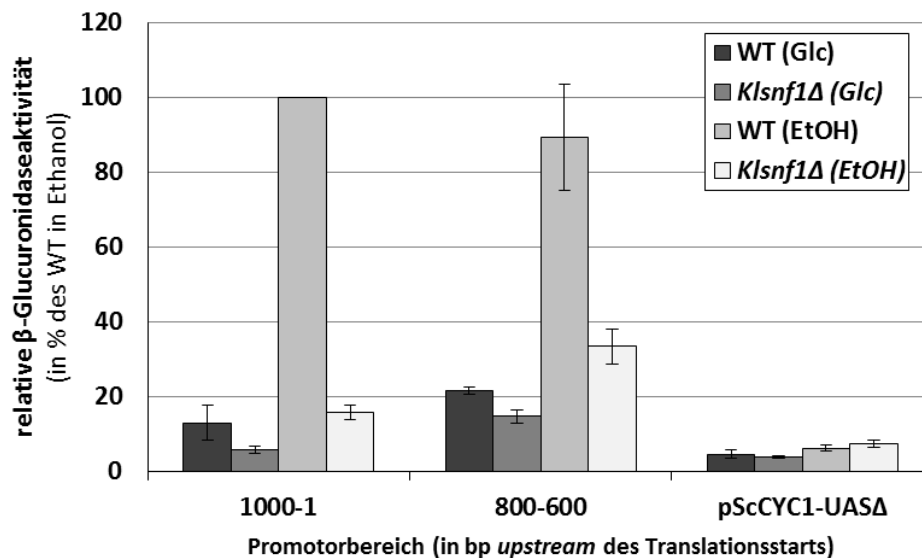
**Abbildung 38: Identifizierung von UAS<sub>KIFBP1</sub>.**

Plasmide mit verschiedenen  $P_{KIFBP1}$ -*GUS*-Varianten (Abbildung A2) wurden in *K. lactis* Wildtyp (JA6) transformiert, über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen und je 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten für 4 h in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamtproteinrohextrakt wurde isoliert und die *KIFBP1*-Promotoraktivität indirekt durch die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt. Als Negativkontrolle für die 3'-verkürzten Promotor-Konstrukte wurde der *ScCYC1 core*-Promotor ( $P_{ScCYC1-UAS\Delta}$ ) mitgeführt. Dargestellt ist die relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität im Verhältnis zum Wildtyp in Ethanol. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten gemessen in Quadruplikaten.



Interessanterweise führen diese Verkürzungen (am deutlichsten für den Bereich 400-1 bp *upstream* des Start-ATG) auch zu einer leicht gesteigerten Aktivität unter reprimierenden Bedingungen. Deletiert man Bereiche am 3'-Ende des Promotors, so bleiben sogar bis zu einer Verkürzung auf 200 bp (von 800 bis 600 bp *upstream* des ATG) 74% Promotoraktivität erhalten. Der für die 3'-Verkürzungen verwendete *ScCYC1 core*-Promotor (*pScCYC1-UASΔ*) an sich zeigt sowohl in Glukose als auch in Ethanol kaum messbare  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität. Eine weitere Eingrenzung dieses 200 bp-Fragmentes ergab nur noch sehr niedrige Aktivitätswerte (5-14%, Daten nicht gezeigt). So konnte mit diesen Ergebnissen der für die transkriptionelle Aktivierung des *KIFBP1*-Promotors minimal notwendige Bereich auf 800 bis 600 bp *upstream* des Translationsstarts eingegrenzt werden. Dieses *cis*-regulatorische Promotorelement wird nachfolgend als  $UAS_{KIFBP1}$  bezeichnet.

Um sicherzugehen, dass die gemessene Aktivität des ermittelten  $UAS_{KIFBP1}$ -Elements nicht artifizierlicher Natur ist, wurde dieses Promotorkonstrukt hinsichtlich der bereits bekannten *KlSnf1*-Abhängigkeit untersucht. Dafür wurden *GUS*-Plasmide mit dem Volllängenpromotor, dem  $UAS_{KIFBP1}$  und dem *ScCYC1 core*-Promotor in Wildtyp und *KlSnf1Δ*-Stamm transformiert und die Promotoraktivität in Glukose und Ethanol bestimmt.



**Abbildung 39: Aktivierung von  $UAS_{KIFBP1}$  ist abhängig von *KlSnf1*.**

Wildtyp- (JA6) und *KlSnf1Δ*-Zellen (JSD1R) wurden mit den angegebenen  $P_{KIFBP1}$ -*GUS*-Varianten transformiert, über Nacht in selektivem Minimalmedium ( $Ura^-$ ) mit 2% Glukose angezogen und je 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten für 4 h in frisches Minimalmedium mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamtproteinrohextrakt wurde isoliert und die *KIFBP1*-Promotoraktivität indirekt durch die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt. Als Kontrolle wurde der *ScCYC1 core*-Promotor ( $P_{ScCYC1-UASΔ}$ ) mitgeführt. Dargestellt ist die relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität im Verhältnis zum Wildtyp in Ethanol. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten gemessen in Quadruplikaten.

Die Auswertung der Messdaten zeigt, dass sowohl der Volllängenpromotor (1000-1) als auch  $UAS_{KIFBP1}$  (800-600) im Wildtyp in Ethanol eine höhere  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität vermitteln als in Glukose (Abbildung 39). Außerdem führt die *KISNF1*-Deletion bei beiden Promotorvarianten zu einer deutlichen Reduzierung der Reportergenaktivität (um ca. 80% beim Volllängenpromotor, um ca. 65% bei  $UAS_{KIFBP1}$ ). Vom als Kontrolle mitgeführten *ScCYC1 core*-Promotor geht eine minimale Aktivität aus, die nicht *KISnf1*-abhängig ist. Diese Daten bestätigen somit, dass das identifizierte  $UAS_{KIFBP1}$  der minimal benötigte Promotorbereich ist, um eine *KISnf1*-abhängige Induktion des *KIFBP1*-Promotors zu vermitteln.

#### **3.3.4. Der *KIFBP1*-Promotor ist in *S. cerevisiae* transkriptionell inaktiv**

Die vorangegangenen Deletionsanalysen dieser Arbeit haben gezeigt, dass anscheinend keiner der TFs, der in *S. cerevisiae* für die Aktivierung des *ScFBP1*-Promotors benötigt wird, in *K. lactis* relevant für die *KIFBP1*-Expression ist (Abbildung 37). Nichtsdestotrotz ist die Kohlenstoffregulation in den beiden Hefen konserviert. Es wäre daher möglich, dass in *S. cerevisiae* ein homologes Protein existiert, das die Rolle des *KIFBP1*-Aktivators übernehmen kann. Um zu überprüfen, ob *KIFBP1* auch in *S. cerevisiae* transkriptionell aktiviert wird, wurde das *GUS*-Gen unter der Kontrolle des *KIFBP1*-Volllängenpromotors in einen in *S. cerevisiae* replizierenden Vektor (YEplac195) kloniert und die Aktivität des Promotors unter reprimierenden und induzierenden Bedingungen gemessen. Als Kontrolle diente ein unter dem *ScFBP1*-Promotor exprimiertes *GUS*-Gen. Den Erwartungen entsprechend konnte für den Glukose-reprimierten *ScFBP1*-Promotor in Glukose keine Aktivität detektiert werden, wohingegen Ethanol die *ScFBP1*-Expression induziert und die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität ansteigt (Tabelle 9). Für den *KIFBP1*-Promotor konnten jedoch weder in Glukose noch in Ethanol messbare  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitäten detektiert werden. Die Messwerte lagen hier unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Daten deuten darauf hin, dass *KIFBP1* möglicherweise von einem Transkriptionsfaktor reguliert wird, der in *S. cerevisiae* nicht existiert. Es wäre allerdings ebenso vorstellbar, dass dieser Faktor zwar in beiden Hefen vorhanden ist, dessen Funktion sich aber in *K. lactis* divergent von der in *S. cerevisiae* entwickelt hat und deshalb nur in *K. lactis* die Induktion der *KIFBP1*-Expression vermitteln kann.

**Tabelle 9: Der *KIFBP1*-Promotor ist in *S. cerevisiae* nicht induzierbar.**

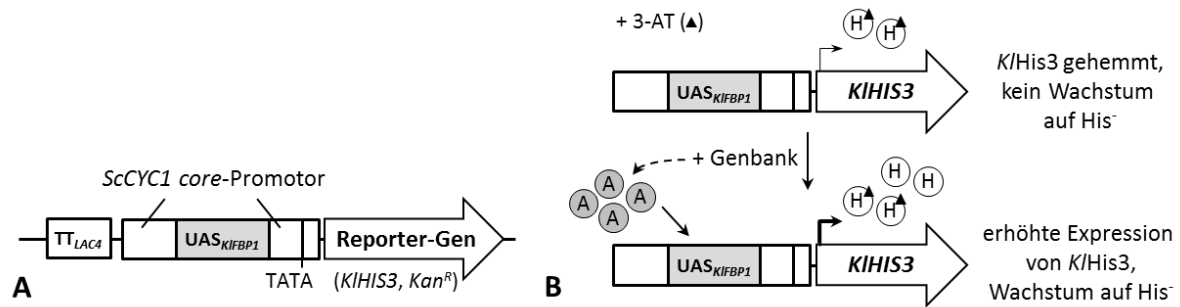
Stamm	Promotor	Plasmid	$\beta$ -Glucuronidaseaktivität (mU/mg Protein)	
			Glukose (SD)	Ethanol (SD)
W303	<i>KIFBP1</i>	pXY74	0,5 ( $\pm$ 0,23)	1,0 ( $\pm$ 0,12)
W303	<i>ScFBP1</i>	pXY101	0,3 ( $\pm$ 0,22)	66,1 ( $\pm$ 6,77)

Die unten aufgeführten Plasmide wurden in *S. cerevisiae* WT-Zellen (W303) transformiert und über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen. Je 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurden für 4 h in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol überführt, Gesamtproteinrohextrakt isoliert und die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität bestimmt. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei biologischen Replikaten, gemessen in Quadruplikaten.

### 3.3.5. Etablierung eines genetischen Ansatzes, um UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-Transaktivatoren zu finden

Nach Identifizierung von UAS<sub>*KIFBP1*</sub> sollten nun Faktoren identifiziert werden, die darin enthaltene Sequenzen erkennen, binden und eine Aktivierung vermitteln können. Dies sollte mit Hilfe eines genetischen Ansatzes bewerkstelligt werden, bei dem ein Wachstumsdefekt durch UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-bindende Transaktivatoren aufgehoben wird. Dafür wurde ein Reporterstamm konstruiert (AKY2), mit dem ein *Screening* hinsichtlich einer gesteigerten UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-Aktivität erfolgen kann. In diesem Reporterstamm wird die Expression zweier Reporterogene (*KIHIS3*, *Kan<sup>R</sup>*) durch UAS<sub>*KIFBP1*</sub> kontrolliert (Köppen, 2015, Abbildung 40A).

Für den genetischen Ansatz wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Überexpression eines potentiellen Aktivators die Promotoraktivität von UAS<sub>*KIFBP1*</sub> auch in Anwesenheit von Glukose steigert, wodurch die Expression des *KIHIS3*-Reportergens erhöht und die Selektion auf Histidin-Mangelmedium möglich ist. Die Verifizierung putativer Aktivatoren sollte durch ein zweites UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-reguliertes Reporterogen (*Kan<sup>R</sup>*) erfolgen. Aus *Northern Blot*-Analysen (Abbildung 36) geht hervor, dass *KIFBP1* auch in Glukose exprimiert wird. Zudem zeigten die Promotor-Analysen eine basale Aktivität von UAS<sub>*KIFBP1*</sub> (Abbildung 38). Voruntersuchungen zur Etablierung des genetischen Ansatzes ergaben in der Tat eine relativ hohe Basalaktivität von UAS<sub>*KIFBP1*</sub> in Glukose (Köppen, 2015). Basal exprimiertes *Kan<sup>R</sup>* vermittelte dem Reporterstamm eine Geneticin-Resistenz, die durch Erhöhung der Geneticin-Konzentration nicht überwunden werden konnte, weshalb die geplante Verifizierung potentieller Aktivatoren mithilfe der *Kan<sup>R</sup>*-Expression nicht möglich war. Dagegen konnte basal exprimiertes *KIHIS3* durch Zugabe des kompetitiven Inhibitors 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) gehemmt werden, sodass der Reporterstamm auf His<sup>-</sup>-Medium mit 2% Glukose und 30 mM 3-AT ein stark eingeschränktes Wachstum zeigt (Köppen, 2015).

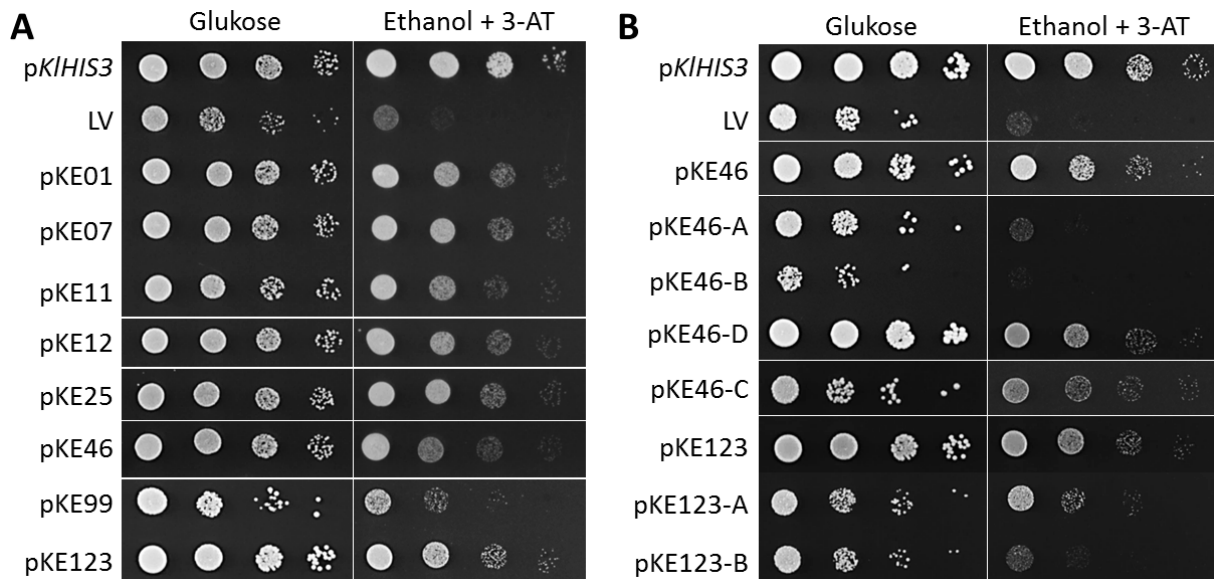


**Abbildung 40: Genetischer Ansatz zur Identifizierung UAS<sub>KIFBP1</sub>-aktivierender Faktoren.**

**A.** Schematische Abbildung der verwendeten Reporterkonstrukte. Das UAS<sub>KIFBP1</sub>-Element wird flankiert vom ScCYC1 core-Promotor und reguliert die Expression der Reporterogene *KIHIS3* und *Kan<sup>R</sup>*. Upstream vom Promotor liegt eine LAC4-Terminatorsequenz (TT<sub>LAC4</sub>). **B.** UAS<sub>KIFBP1</sub> vermittelt basale *KIHIS3*-Expression. Durch Zugabe des kompetitiven Inhibitors 3-AT (▲) wird basal gebildetes *K/His3* (H) gehemmt, was zu einem Wachstumsdefekt auf Histidin-Mangelmedium führt. Die Überexpression eines potentiellen Aktivators (A) aus einer multicopy-Genbank führt zu einer gesteigerten *KIHIS3*-Expression und supprimiert den His<sup>-</sup>-Wachstumsdefekt.

Für den genetischen Ansatz kann also unter diesen Bedingungen auf Plasmide einer multicopy-Genbank (*Curie Pool*) selektiert werden, deren Genprodukte für potentielle Aktivatoren kodieren, die zu einer Erhöhung der UAS<sub>KIFBP1</sub> vermittelten *KIHIS3*-Expression führen und den Wachstumsdefekt aufheben (Abbildung 40B). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten allerdings ausschließlich Plasmide isoliert werden, die den *KIHIS3*-Lokus enthielten. Diese Plasmide wurden erwartet und können als Positivkontrolle für den genetischen Ansatz angesehen werden, da zusätzliche Kopien von *KIHIS3* zu einer gesteigerten *K/His3*-Produktion führen. Weshalb neben *KIHIS3*-enthaltenden Plasmiden keine weiteren Genbank-Varianten als Suppressoren isoliert wurden, könnte verschiedene Ursachen haben: a) die Überexpression eines einzelnen Gens ist nicht ausreichend für die Aktivierung von UAS<sub>KIFBP1</sub>, da mehrere Faktoren zusammen wirken; b) der potentielle Aktivator benötigt Co-Faktoren oder Modifizierungen, die in Glukose nicht vorhanden sind.

In einem zweiten Anlauf wurde das Experiment daher mit Ethanol im Medium wiederholt. Aus 200 Transformanten konnten 17 Plasmide isoliert werden, die nicht *KIHIS3* enthielten, aber dennoch eine Suppression des Wachstumsdefekts vermitteln. Für phänotypische Analysen wurden die isolierten Plasmide in den Reporterstamm transformiert und hinsichtlich ihres Wachstums auf 3% Ethanol und 30 mM 3-AT analysiert (Abbildung 41A). Alle 17 Plasmide (hier exemplarisch 8 dargestellt) waren in der Lage, den His<sup>-</sup>-Wachstumsdefekt auf 30 mM 3-AT zu supprimieren. Als Kontrolle dienten der Leervektor und ein aus der Genbank isoliertes Plasmid mit *KIHIS3*-ORF (*pKIHIS3*), die wie erwartet ein deutlich eingeschränktes Wachstum bzw. die Suppression des Wachstumsdefekts zeigen.



**Abbildung 41: Acht isolierte Plasmide supprimieren den His<sup>-</sup>-Wachstumsdefekt von AKY2.**

**A.** Zellen des Reporterstammes AKY2 wurden mit den isolierten Plasmiden aus der Genbank sowie dem Leervektor (LV, KEp6) und *pKIHIS3* transformiert, über Nacht in Minimalmedium (Ade<sup>+</sup>) mit 2% Glukose angezogen und eine serielle Verdünnung auf Minimalmedium (Ade<sup>+</sup>) mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol und 30 mM 3-AT getropft. Die Inkubation erfolgte für 3 (Glukose) bzw. 7 Tage (Ethanol) bei 30°C. **B.** Zur Identifizierung des Suppressorgens bei Plasmiden mit mehreren ORFs wurden die einzelnen Gene subkloniert. Daraus entstandene Plasmide sowie deren Ausgangsformen wurden wie in A beschrieben angezogen und phänotypisch charakterisiert.

Isolierte Plasmide wurden mit pKE<sub>xx</sub> bezeichnet. Anhand einer Restriktionsenzymanalyse konnten identische Plasmide einander zugeordnet werden, sodass letztendlich acht Plasmide mit unterschiedlichen Genomfragmenten weiter analysiert wurden. Nach Sequenzierung konnten diese acht Plasmide aufgrund ihres enthaltenen genomischen Bereichs in fünf Gruppen unterteilt werden (Tabelle 10). Ein Überblick zu den genomischen Inserts befindet sich in Tabelle A11. Zur ersten Gruppe gehören Plasmide, welche *rDNA* Gen *cluster* oder Gene für ribosomale Proteine enthalten. Diese Treffer tauchen relativ häufig bei der Verwendung von *multicopy*-Genbanken auf (persönliche Mitteilung K. Breunig) und können als falsch positiv angesehen werden. Zur zweiten Gruppe gehören Plasmide, die das *KLLA0A11770g*-Gen tragen, welches für eine hoch-affine Histidin-Permease kodiert. Neben *KIHIS3* ist dies das zweite Gen, das am Histidin-Stoffwechsel beteiligt ist und auf eine UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-unabhängige Weise den Wachstumsdefekt supprimieren kann. Zu Gruppe drei gehören zwei Plasmidtypen, die sich überschneidende genomische Fragmente tragen. Da auf dem Insert von pKE11 jedoch nur ein vollständiger ORF liegt, konnte in dieser Gruppe *KLLA0D09240g* als Suppressorgen identifiziert werden. Dieses Gen ist homolog zu *GAC1* aus *S. cerevisiae*. *ScGAC1* kodiert für eine regulatorische Untereinheit der *ScGlc7*-Phosphatase, die durch die Bindung von *ScGac1* an die Glykogensynthese *ScGys2* geführt wird.

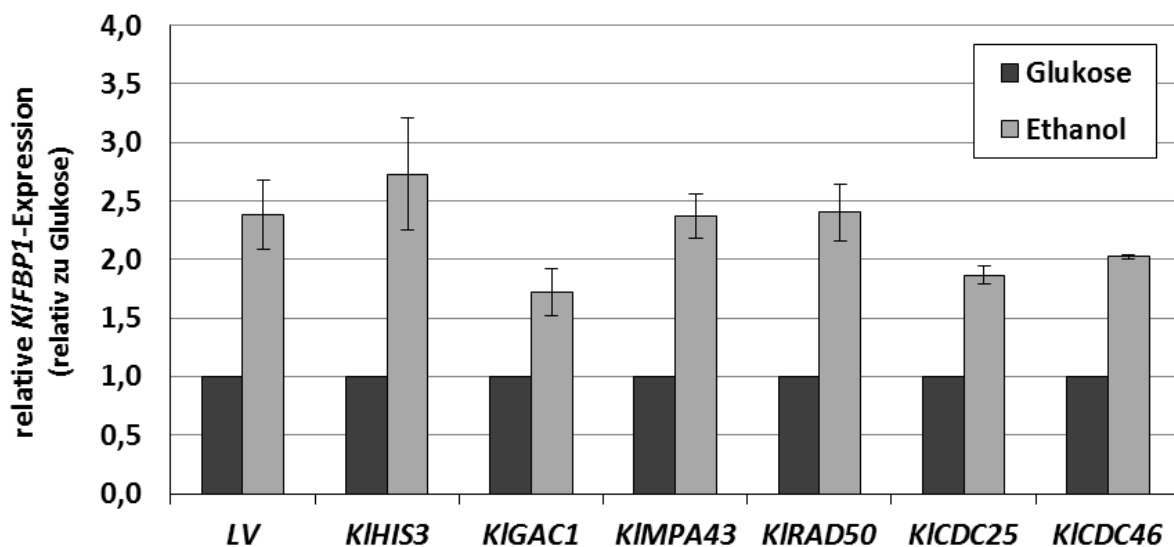
**Tabelle 10: Aus Genbank „Curie Pool“ isolierte Suppressor-Plasmide.**

Gruppe	Bezeichnung (pKExx)	Genomfragment	isolierte Anzahl	identifizierter Suppressor	Homolog in <i>S. cerevisiae</i>
1	01	1.492.319 - 1.498.973	1 x	<i>rDNA cluster</i> ,	-
	150	1.495.098 - 1.502.426	1 x	ribosomale RNA	
	169	1.501.915 - 1.506.714	1 x		
	197	1.499.415 - 1.504.179 (Chromosom D)	1 x		
2	07	1.010.070 - 1.020.578	2 x	<i>KLLA0A11770g</i>	<i>HIP1</i>
	12	1.013.488 - 1.018.068 (Chromosom A)	1 x		
3	11	775.435 - 780.608	2 x	<i>KLLA0D09240g</i>	<i>GAC1</i>
	99	774.550 - 785.717 (Chromosom D)	1 x		
4	25	256.455 - 268.456	2 x	<i>KLLA0C02937g</i>	<i>MPA43</i>
	46	257.088 - 266.916 (Chromosom C)	4 x	<i>KLLA0C02915g</i>	<i>RAD50</i>
5	123	780.083 - 788.623 (Chromosom D)	1 x	<i>KLLA0D09306g</i>	<i>CDC25</i>

Aufgelistet sind die in fünf Kategorien unterteilten Plasmide, die einen His<sup>-</sup>-Wachstumsdefekt des Reporterstammes AKY2 auf 3% Ethanol und 30 mM 3-AT supprimieren. Durch Sequenzierung mit V10 und V11 wurden die im KEp6-Plasmid inserierten Genomfragmente ermittelt. Insofern auf einem Genomfragment mehrere Gene lagen, wurde das Suppressor-Gen über Subklonierung identifiziert. Eine Übersicht über annotierte Gene im jeweiligen Genomfragment befindet sich in Tabelle A11.

Zu Gruppe vier gehören zwei Plasmidtypen, wobei das Insert von pKE46 ein Subfragment des Inserts von pKE25 ist. Auf dem fast 10 kb großen Insert liegen vier vollständige ORFs, sodass zunächst über Subklonierung das Gen identifiziert werden musste, das den Wachstumsdefekt supprimiert. Anhand der phänotypischen Analyse der subklonierten Gene (Abbildung 41B, pKE46-A bis -D) zeigen zwei Subklone einen Suppressor-Effekt. pKE46-C enthält *KLLA0C02915g*, welches homolog zu *ScRAD50* und somit als Untereinheit des MRX-Komplexes an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. *KLLA0C02937g* auf pKE46-D kodiert für Protein mit unbekannter Funktion, das eine Zuckerkinase-Domäne enthält ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). *ScMPA43* wurde als *multicopy*-Aktivator von *ScPDC1* (Pyruvatdecarboxylase) identifiziert (persönliche Mitteilung E. Boles). Zu Gruppe fünf gehört ein Plasmid, das ein ca. 8 kb großes Genomfragment trägt, auf dem zwei ORFs annotiert sind. Die phänotypische Analyse der subklonierten Gene (Abbildung 41B, pKE123-A und pKE123-B) verdeutlicht, dass pKE123-A (enthält *KLLA0D09306g*) die Suppression des Wachstumsdefekts vermittelt. *KLLA0D09306g* ist homolog zu *ScCDC25* und kodiert für einen GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) des Ras-Signalwegs.

Die in diesem Ansatz isolierten Suppressorgene sollten abschließend hinsichtlich ihres Einfluss auf die *KIFBP1*-Expression überprüft werden. Dafür wurden AKY2-Zellen mit den Suppressorgen-enthaltenen Plasmiden sowie dem Leervektor, *pKIHIS3* und *pKE123-B* (enthält *KICDC46*) als Negativ-Kontrollen transformiert und die *KIFBP1*-Level in Glukose und Ethanol mittels qRT-PCR analysiert. Wie zu erwarten war, führt die Überexpression von *KIHIS3* und *KICDC46* im Vergleich zum Leervektor zu keiner gesteigerten Genexpression von *KIFBP1*. Jedoch konnte auch durch die Überexpression der identifizierten Suppressorgene keine gesteigerten *KIFBP1*-Levels detektiert werden (Abbildung 42). Die potentiellen Aktivatoren wirken also nicht induzierend auf die *KIFBP1*-Expression und demzufolge höchstwahrscheinlich auch nicht spezifisch auf die Reporterexpression. Die Überexpression der potentiellen Aktivatoren führt scheinbar nur indirekt zu einer erhöhten *KIHIS3*-Expression und verursacht damit das verbesserte Wachstum des Reporterstammes unter den gewählten Selektionsbedingungen.



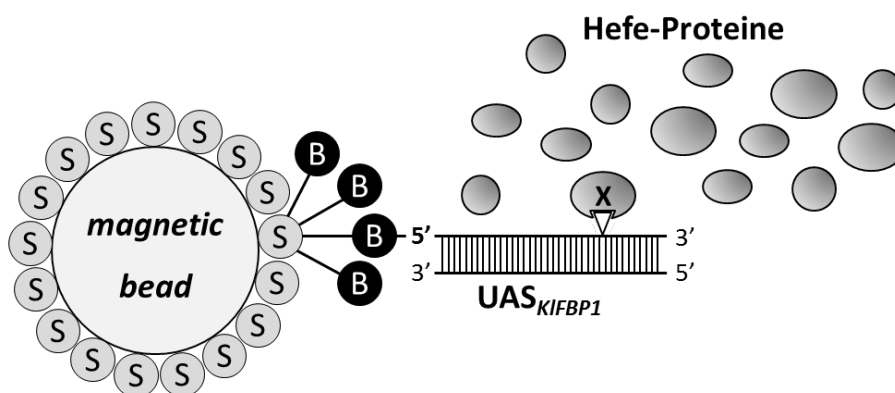
**Abbildung 42: Potentielle Aktivatoren haben keinen Einfluss auf *KIFBP1*-Expression.**

AKY2 wurden mit dem Leervektor (LV; KEp6), *pKIHIS3* sowie den Suppressor-Plasmiden *pKE11* (*KIGAC1*), *pKE46-D* (*KIMPA43*), *pKE46-C* (*KIRAD50*) und *pKE123-A* (*KICDC25*) sowie als Kontrolle mit dem nicht-Suppressor-Plasmid *pKE123-B* (*KICDC46*) transformiert, in Minimalmedium (Ura<sup>r</sup>) mit 2% Glukose vorangezogen und für vier Stunden in Medium mit 3% Ethanol überführt. Gesamt-RNA wurde isoliert und Gen-Expressionslevel mit qRT-PCR analysiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und Normalisierung zum Referenzgen *KIALG9* im Verhältnis zu Glukose. Die Messungen wurden in technischen Triplikaten an drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.3.6. Isolierung UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindender Proteine mittels *Pulldown*-Assay

Im Ergebnis des genetischen Ansatzes konnte unter den hier durchgeführten Bedingungen leider kein transaktivierender Faktor des *KIFBP1*-Promotors isoliert werden. In einem weiteren, biochemischen Ansatz sollten daher mittels *Pulldown*-Assay Proteine isoliert werden, die an UAS<sub>KIFBP1</sub> binden können. Für diese Untersuchung wurde die UAS<sub>KIFBP1</sub>-Sequenz an einem 5'-Ende biotinyliert und an mit Streptavidin-ummantelte Magnet-*Beads* gekoppelt. Anschließend wurden diese mit Rohextrakt aus einer Hefekultur versetzt, die in Anwesenheit von Ethanol angezogen wurde (siehe Abbildung 43). Als Kontrolle wurden in einem parallelen Ansatz *Beads*, die nicht mit UAS<sub>KIFBP1</sub> gekoppelt wurden, mitgeführt, um zwischen spezifisch- und unspezifisch-bindenden Proteinen unterscheiden zu können.

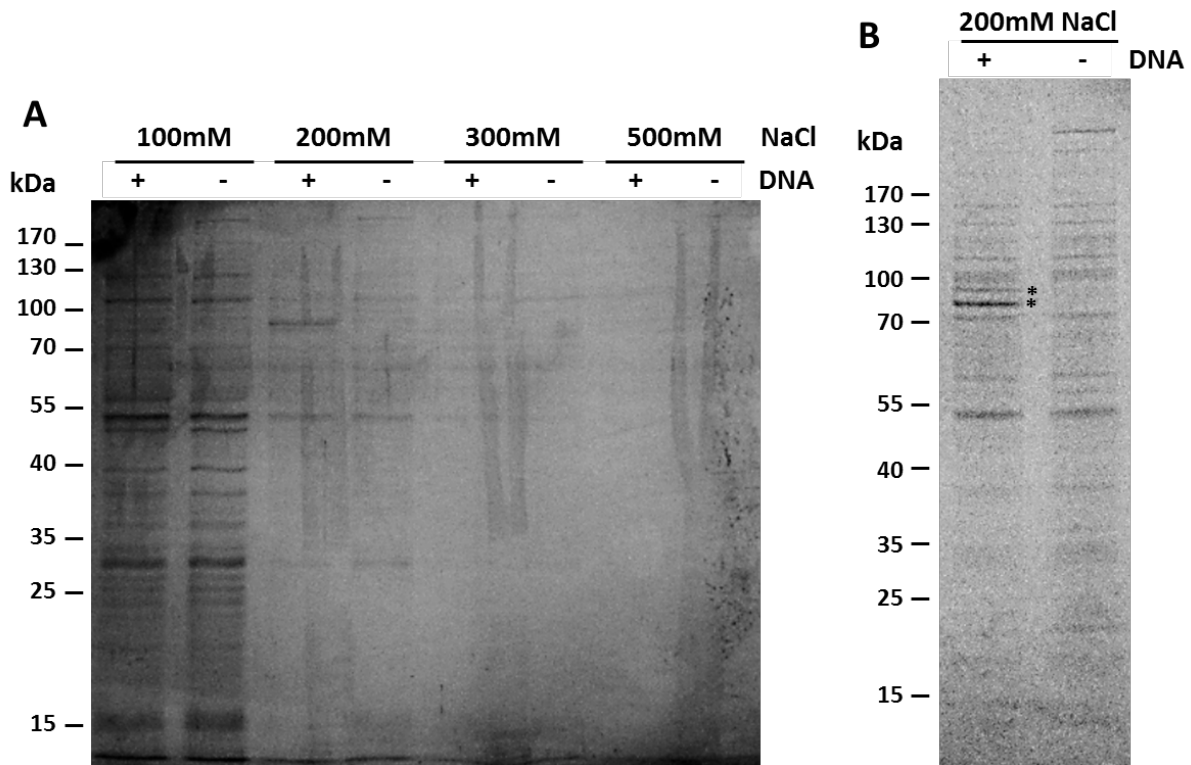
Das Loslösen der Proteine von der DNA erfolgte über einen NaCl-Gradienten (100 mM bis 1 M). Anschließend wurden die Eluate auf einem 10%-igen PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (siehe Abbildung 44A). Wie zu erwarten war, nimmt die Menge der gelösten DNA-bindenden Proteine von 100 mM zu 500 mM drastisch ab, da unspezifisch gebundene Proteine oder Proteine mit niedriger Affinität bei niedrigen Salz-Konzentrationen von der DNA gelöst werden. Typischerweise eluieren Proteine mit hoher Affinität bei Salzkonzentrationen > 500 mM (Jutras *et al.*, 2013). Da allerdings ab 300 mM die Signalstärke der Proteine eine Analyse kaum mehr ermöglicht und bei 200 mM NaCl augenscheinlich unterschiedliche Bandenmuster auftreten (Abbildung 44A, Vergleich Spur 3 und 4), wurden diese beiden Eluate auf einem präparativen 4-12%-igen PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 44B).



**Abbildung 43: *Pulldown* zur Isolierung UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindender Proteine.**

Schematische Darstellung des *Pulldown*-Experiments zur Isolierung DNA-bindender Proteine. UAS<sub>KIFBP1</sub> wurde an einem 5'-Ende biotinyliert und an mit Streptavidin ummantelte Magnet *beads* gekoppelt, wobei ein Streptavidin-Molekül bis zu vier Biotin-Moleküle binden kann. Durch Zugabe von Hefe-Rohextrakt können spezifisch an UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindende Proteine angereichert werden.





**Abbildung 44: Elution UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindender Proteine von Magnet beads.**

Nach erfolgtem *Pulldown*-Experiment wurden die DNA-gebundenen Proteine mittels NaCl-Gradienten von der DNA gelöst und eluiert. **A.** 10  $\mu$ l der Elutionsfraktionen wurden zur ersten Analyse auf einem 10%-iges PAA-Gel analysiert. Da nach der Elution mit 750 mM und 1 M NaCl keine Proteine durch Coomassie-Färbung visualisiert werden konnten, zeigt die Abbildung nur die ersten vier Eluate. **B.** 15  $\mu$ l der Eluate nach Zugabe von 200 mM NaCl wurden auf einem präparativen 4-12%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Banden wurden aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Zwischen 70 und 100 kDa sind eindeutig zwei Banden zu erkennen, die nur dann auftreten, wenn UAS<sub>KIFBP1</sub> an die Magnet beads gekoppelt wurde (+ DNA, mit Stern (\*) markiert). Die Banden wurden aus dem Gel geschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse an den universitätsinternen Service übergeben. Bei dieser Analyse konnten 5 Peptide sequenziert werden, die alle dem Protein KLLA0F04389p zugeordnet werden konnten (Tabelle 11). Die zweite Proteinbande, die auf dem Coomassie-gefärbten Gel zu sehen gewesen war, ging eventuell beim Ausschneiden des Gelstückes verloren. Mit dem hier durchgeführten *Pulldown* Experiment konnte jedoch KLLA0F04389p (*K/Reb1*) als potentiell UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindender Faktor isoliert werden. Reb1 wurde zuerst in *S. cerevisiae* als *rDNA enhancer* bindendes Protein identifiziert (Morrow *et al.*, 1989). Neben seiner Funktion bei der Pol I-vermittelten Transkription von rRNA Genen (Kulkens *et al.*, 1992) spielt es außerdem eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von Pol II-Genen sowie bei der Termination von kryptischen Pol II-Transkripten (Brandl und Struhl, 1990; Colin *et al.*, 2014).

**Tabelle 11: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse.**

Peptidsequenz	Protein	Start (AS)	Ende (AS)
(K)VLSSSESHNDDQDDVSNLIQEAAAK(A)	KLLA0F04389p	227	253
(R)SYGDLSNIDDHVDDVSVSGSIPSQVR(L)	KLLA0F04389p	191	218
(R)DANDVSAVAAA AVAAALS VK(K)	KLLA0F04389p	68	89
(K)ELVGYPEASLPLDDEIR(Q)	KLLA0F04389p	567	585
(K)SFDESEEEALEQFIK(E)	KLLA0F04389p	266	282

Dargestellt sind die sequenzierten Peptide als Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der UAS<sub>KIFBP1</sub>-bindenden Proteine. Durch Abgleich der Peptide mit dem *K. lactis* Proteom konnten alle Peptide dem Protein KLLA0F04389p (*K/Reb1*) zugeordnet werden.

Fedor *et al.* (1988) zeigten außerdem, dass ScReb1 (dort noch „Faktor Y“) am UAS<sub>G</sub> des *ScGAL4/10*-Promotors sequenzspezifisch zur Bildung eines NFR (Nukleosomen-freie Region) beiträgt. Das *K. lactis*-Homolog von ScReb1 wurde bereits 1993 von Morrow, Ju und Warner identifiziert. Bisherige Untersuchungen in der Milchhefe verdeutlichten die Bedeutung von *K/Reb1* für die Stilllegung der *Mating Type*-Loci *KIHMLα* und *KIHMRα* (Sjöstrand *et al.*, 2002).

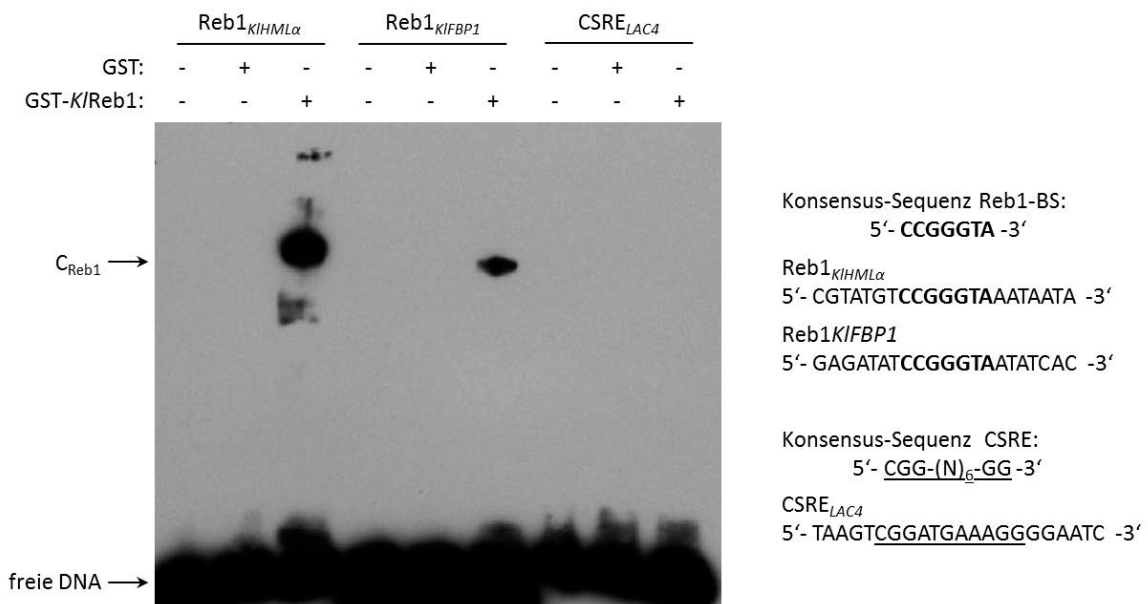
In beiden Hefespezies ist die Funktion von Reb1 essentiell für das Zellwachstum (Ju *et al.*, 1990; Sjöstrand *et al.*, 2002). Reb1 enthält zwei myb-ähnliche Domänen, die durch eine Linker-Region voneinander getrennt sind (Morrow *et al.*, 1993) und ähnelt damit strukturell anderen Myb-verwandten DNA-Bindeproteinen aus zum Beispiel Hefe (*ScRap1*; König *et al.*, 1996) und Maus (*MIDA1*; Sitzmann *et al.*, 1996). Obwohl *K/Reb1* 25% kleiner ist als ScReb1 und die beiden Proteine nur zu 40% identisch sind, können sie sich in beiden Organismen gegenseitig ersetzen (Morrow *et al.*, 1993; Sjöstrand *et al.*, 2002). ScReb1 und *K/Reb1* binden sequenzspezifisch DNA mit der Konsensus-Sequenz 5'-CCGGGTA-3' (Morrow *et al.*, 1989; Sjöstrand *et al.*, 2002), wobei neuere bioinformatische Auswertungen genomweiter Expressions- und CHIP-Chip-Daten in *S. cerevisiae* ein leicht verändertes Bindemotiv (5'-CGGGTAA-3') ergaben (Chen *et al.*, 2008; Pachkov *et al.*, 2007).

### 3.3.7. GST-*K/Reb1* bindet am UAS<sub>KIFBP1</sub>

Durch *in silico*-Analysen konnte tatsächlich eine potentielle Reb1-Bindestelle innerhalb von UAS<sub>KIFBP1</sub> mit der Sequenz 5'-CCGGGTA-3' identifiziert werden. Diese befindet sich im chromosomalen Kontext 770 bp *upstream* des Start-ATG. Da allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, dass *K/Reb1* im *Pulldown*-Experiment nur unspezifisch an UAS<sub>KIFBP1</sub> gebunden hat, sollte nachfolgend die Spezifität der Bindung untersucht werden.

Dafür wurde *K/Reb1* N-terminal mit GST fusioniert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und über GST-Affinitätssäulen aufgereinigt. Als Kontrolle wurde GST allein ebenso aufgereinigt. Um zu überprüfen, ob GST-*K/Reb1* an die vorhergesagte Reb1-Bindestelle in  $UAS_{KIFBP1}$  spezifisch bindet, wurden nicht-radioaktive EMSA-Analysen durchgeführt. Zunächst sollte ermittelt werden, ob GST-*K/Reb1* überhaupt an DNA mit vorhergesagter Reb1-Bindestelle binden kann. Dafür wurden GST und GST-*K/Reb1* mit den Oligonukleotiden  $Reb1_{KIHML\alpha}$ ,  $Reb1_{KIFBP1}$  und  $CSRE_{LAC4}$  inkubiert (Abbildung 45). Dabei dient  $Reb1_{KIHML}$  als Positivkontrolle, da dort die Bindung durch *K/Reb1* bereits gezeigt werden konnte (Sjöstrand *et al.*, 2002) und  $CSRE_{LAC4}$  als Negativkontrolle, da es keine Reb1-Bindestelle enthält.

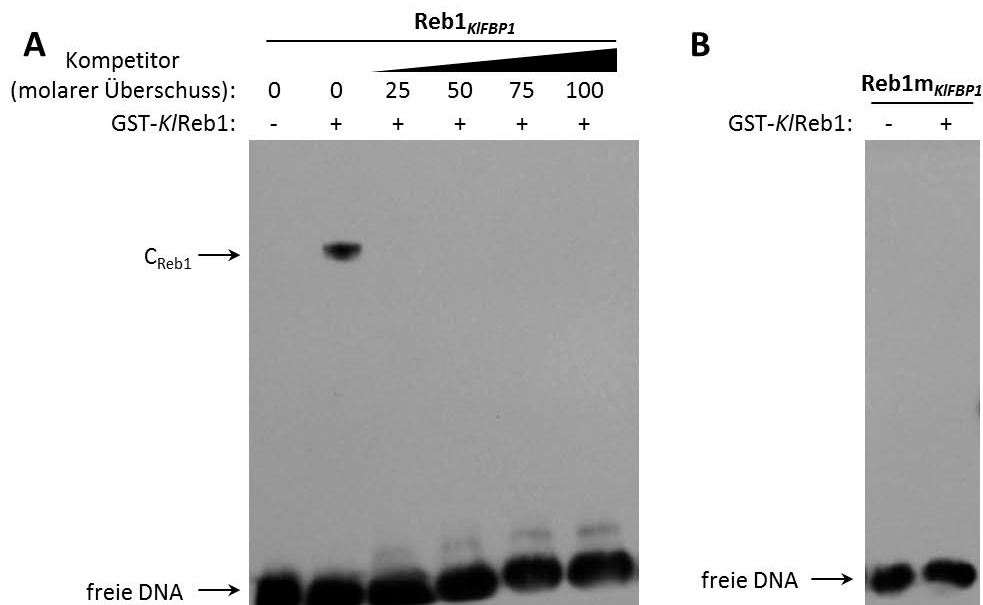
Aus den EMSA-Analysen geht hervor, dass die Zugabe von GST-*K/Reb1*, aber nicht von GST allein, zu einem verzögerten Laufverhalten der Biotin-markierten DNA von  $Reb1_{KIHML\alpha}$  und  $Reb1_{KIFBP1}$  führt (Abbildung 45). Das zeigt, dass GST-*K/Reb1* an diese beiden Oligonukleotide binden kann. Für  $CSRE_{LAC4}$  kann nur freie DNA detektiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass GST-*K/Reb1* nur an DNA bindet, in der eine Reb1-Bindestelle vorhanden ist. Interessanterweise ist das Signal für GST-*K/Reb1*-gebundenes  $Reb1_{KIFBP1}$  schwächer als für gebundenes  $Reb1_{KIHML\alpha}$ , was auf eine niedrigere Affinität von GST-*K/Reb1* zu  $Reb1_{KIFBP1}$  hinweisen könnte.



**Abbildung 45: GST-*K/Reb1* bindet nur DNA mit Reb1-Konsensusmotiv.**

EMSA-Analysen zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GST-*K/Reb1* an bekannten und vorhergesagten Reb1-Bindestellen. 0,5 µg GST bzw. GST-*K/Reb1* wurden mit 10 fmol Biotin-markierten Oligonukleotiden ( $Reb1_{HML}$ ,  $Reb1_{KIFBP1}$  und  $CSRE_{LAC4}$ ) inkubiert und auf einem nativen 5%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis Biotin-markierter DNA erfolgte über Chemilumineszenz.

Anschließend sollte die Spezifität der Bindung durch eine Wettbewerbsanalyse untersucht werden. Zur Bindereaktion von GST-*K/Reb1* und *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub> wurde ein 25- bis 100-facher molarer Überschuss an nicht-markiertem *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub> hinzugegeben. Dadurch konnte die GST-*K/Reb1*-gebundene markierte *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub>-DNA durch die unmarkierte DNA verdrängt werden (Abbildung 46A). Sjöstrand *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Bindung von *K/Reb1* an *Reb1*<sub>*KIHMLα*</sub> durch eine Mutation der *Reb1* Konsensus-Sequenz von 5'-CCGGGTA-3' zu 5'-CCGGtA-3' verloren geht. In einer weiteren EMSA-Analyse wurde daher ein *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub>-Oligonukleotid verwendet, bei dem die *Reb1*-Bindestelle analog dazu mutiert wurde (*Reb1m*<sub>*KIFBP1*</sub>). Aus Abbildung 46B ist ersichtlich, dass diese Mutation zum Verlust der detektierbaren Bindung von GST-*K/Reb1* an *Reb1m*<sub>*KIFBP1*</sub> führt. Die Bindung von GST-*K/Reb1* an die *Reb1*-Bindestelle im *KIFBP1*-Promotor ist also spezifisch.



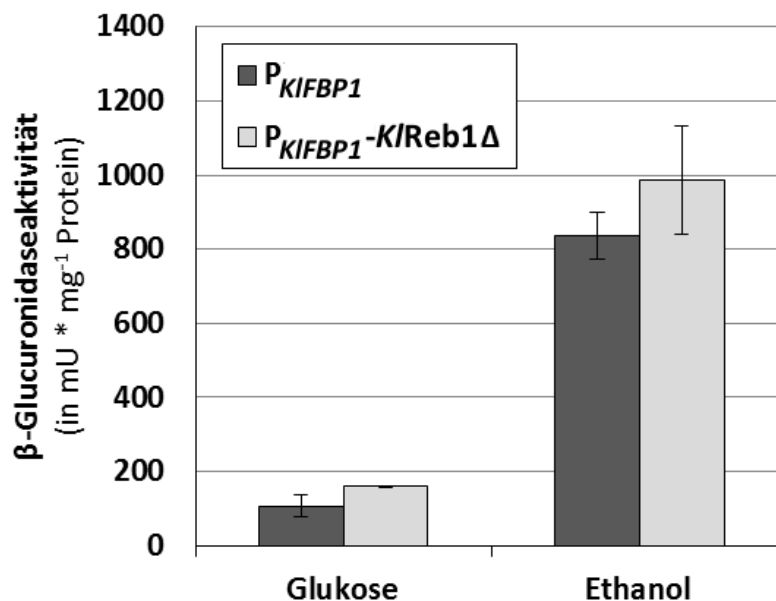
**Abbildung 46: Die Bindung von GST-*K/Reb1* an *KIFBP1*-Promotor ist spezifisch.**

EMSA-Analysen zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GST-*K/Reb1* am *KIFBP1*-Promotor. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem nativen 5%-igen PAA-Gel und der Nachweis Biotin-markierter DNA über Chemilumineszenz. **A.** 0,5 µg GST-*K/Reb1* wurden mit 10 fmol Biotin-markierten *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub> inkubiert und die Bindung mit einem 25-, 50-, 75- und 100-fachen molaren Überschuss an unmarkiertem *Reb1*<sub>*KIFBP1*</sub> kompetiert. **B.** 0,5 µg GST-*K/Reb1* wurden mit 10 fmol Biotin-markierten *Reb1m*<sub>*KIFBP1*</sub> (Mutation der *Reb1*-Bindestelle) inkubiert.

### 3.3.8. Deletion der *K/Reb1*-Bindestelle beeinflusst Promotoraktivität nicht *in vivo*

*K/Reb1* bindet also an eine vorhergesagte Bindestelle im *KIFBP1*-Promotor. Es wäre durchaus vorstellbar, dass *K/Reb1* an der Ausbildung einer NFR beteiligt ist, die den Zugang von potentiellen Transkriptionsaktivatoren am Promotor ermöglichen könnte. Um die Bedeutung der *K/Reb1*-Bindung für die *KIFBP1*-Expression *in vivo* zu untersuchen, wurde daher die

*K/Reb1*-Bindestelle im *KIFBP1*-Volllängenpromotor eines  $\beta$ -Glucuronidase-Reporterplasmids deletiert (=P<sub>*KIFBP1*</sub>-*K/Reb1* $\Delta$  (pXY134)). Die Promotoraktivität von P<sub>*KIFBP1*</sub>-*K/Reb1* $\Delta$  sowie von P<sub>*KIFBP1*</sub> wurde im Wildtyp in Glukose und Ethanol bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp-Promotor P<sub>*KIFBP1*</sub> führt die Deletion der *K/Reb1*-Bindestelle im *KIFBP1*-Promotor allerdings weder in Glukose noch in Ethanol zu Unterschieden in der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität (Abbildung 47). Dieses Ergebnis bedeutet entweder, dass die *K/Reb1*-Bindung am *KIFBP1*-Promotor *in vivo* nicht relevant für die Regulation der *KIFBP1*-Expression ist, oder aber die Deletion der *K/Reb1*-Bindestelle allein nicht ausreicht, um einen Effekt auf die Promotoraktivität zu bewirken. Am *ScCLN2*-Promotor in *S. cerevisiae* sind mehrere Faktoren (u.a. *ScRap1*, *ScReb1* und *ScRcs3*) an der Ausbildung einer NFR beteiligt (Badis *et al.*, 2008). Untersuchungen dazu ergaben, dass die Deletion einer einzelnen Bindestelle von einem dieser Faktoren nicht ausreicht, um die NFR zu eliminieren. Erst der Verlust aller Bindestellen verhinderte die Ausbildung der NFR (Bai *et al.*, 2011). Möglicherweise konnte deshalb in Ethanol am P<sub>*KIFBP1*</sub>-*K/Reb1* $\Delta$  kein Effekt beobachtet werden, weil auch hier mehrere Faktoren an der Ausbildung einer NFR beteiligt sind.



**Abbildung 47: *K/Reb1*-Bindestelle hat keinen Einfluss auf *KIFBP1*-Promotoraktivität.**

Wildtyp-Zellen (JA6) wurden mit P<sub>*KIFBP1*</sub>-*GUS*-Varianten transformiert, die den Volllängenpromotor ohne (pXY20) und mit Deletion einer *K/Reb1*-Bindestelle (pXY134) tragen. Die Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose angezogen und je 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten für 4 h in Minimalmedium (Ura<sup>-</sup>) mit 2% Glukose bzw. 3% Ethanol überführt. Gesamtproteinrohextrakt wurde isoliert und die *KIFBP1*-Promotoraktivität indirekt durch die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt. Die Standardabweichung errechnet sich aus zwei biologischen Replikaten gemessen in Quadruplikaten.

## 4. Diskussion

Der Kohlenstoffmetabolismus ist essentiell für Energiegewinnung und Biomasseproduktion in allen Lebewesen. Im Laufe der Evolution haben sich viele verschiedene Stoffwechselwege entwickelt, die die Verwertung unterschiedlichster Kohlenstoffquellen ermöglichen. Die meisten Hefen haben sich primär auf die Nutzung von fermentierbaren Zuckern, insbesondere von Glukose, angepasst, können aber auch nicht-fermentierbare Kohlenstoffe wie Ethanol oder Glycerol verstoffwechseln. Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus in Hefen ist hoch konserviert (Flores *et al.*, 2000). Trotzdem zeichnen sich Unterschiede hinsichtlich der transkriptionellen Regulation von Genen, die in diese Stoffwechselwege involviert sind, ab. Der Snf1-Signalweg ist essentiell für die Nutzung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe und vermittelt in der Zelle transkriptomweit Veränderungen der Genexpression. Die Transkriptionsaktivatoren Cat8 und Sip4 spielen dabei eine wichtige Rolle, die sich allerdings in der Crabtree-negativen Hefe *K. lactis* und der Crabtree-positiven Hefe *S. cerevisiae* divergent entwickelt hat (Mehlgarten *et al.*, 2015). Um weitere Einblicke in die Entwicklung des Snf1-kontrollierten Netzwerkes zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die transkriptionelle Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in *K. lactis* unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht.

### 4.1. Verwertung von Ethanol und Glycerol als Kohlenstoffquelle in *K. lactis*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt, um einen Einblick dahingehend zu bekommen, wie *K. lactis* auf den Entzug von Glukose und die Zugabe einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle reagiert. Dabei wurde entweder Ethanol oder Glycerol als alternative C-Quelle verwendet. Anschließend wurden überwiegend Veränderungen im Transkriptlevel (FC) kohlenstoffmetabolischer Gene analysiert. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass es in der Zelle zum einen zu einer generellen Antwort kommt, die sowohl durch Ethanol als auch durch Glycerol hervorgerufen wird, als auch zu einer kohlenstoffspezifischen Antwort, die sich in den beiden C-Quellen unterscheidet. Zur generellen, gemeinsamen Antwort zählen die Induktion von Genen der Gluconeogenese (*KIPCK1*), des Methylcitrat- und Glyoxylat-Zyklus sowie die Hochregulierung von Genen der Fettsäure-Oxidation und des Kohlenstofftransportes (Abbildung 12 und Abbildung 13). Dabei ist jedoch zu beachten, dass diese Gene nicht immer gleich stark hochreguliert werden. Gene des Glyoxylat-Zyklus zeigen in Ethanol höhere Transkriptlevels als in Glycerol, wohingegen

Gene des Methylcitrat-Zyklus und der Fettsäure-Oxidation in Glycerol stärker induziert werden als in Ethanol. Am deutlichsten ist dieser Unterschied für *KICIT3* aufgetreten, das für eine Citrat- und Methylcitrat-Synthase kodiert und in Glycerol über 60-mal stärker induziert wird als in Ethanol. Der Ursache für diese unterschiedlich starke Induktion wurde in dieser Arbeit nicht auf den Grund gegangen. Man könnte jedoch annehmen, dass Glycerol und Ethanol verschiedene Sets an Transkriptionsfaktoren induzieren, die dafür verantwortlich sind. Es ist bereits bekannt, dass die TFs *KICat8* und *KISip4* für die Verwertung von Ethanol, nicht aber von Glycerol, essentiell sind (Mehlgarten *et al.*, 2015). Möglicherweise existieren neben *KICat8* und *KISip4* weitere TFs, die an der Hochregulierung von Genen durch Glycerol beteiligt sind. Zahlreiche kohlenstoffquellenspezifische TFs haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, die meist kombinatorisch die Genexpression beeinflussen. So regulieren z.B. *ScAdr1*, *ScIno2/4* und *ScOpi1* die *ScGUT1*-Transkription (Glycerolkinase) in *S. cerevisiae* und *PpMxr1* (Homolog zu *ScAdr1*) und *PpMpp1* die Methanolverwertung in der Crabtree-negativen Hefe *Pichia pastoris* (Grauslund *et al.*, 1999; Prielhofer *et al.*, 2015). Glycerol könnte aber auch reprimierend auf die Expression eines transkriptionellen Repressors wirken und damit die stärkere Induktion der Gene des Methylcitrat-Zyklus und der Fettsäure-Oxidation beeinflussen. Dass Glycerol analog zur Glukose-Repression die Expression von Genen unterdrückt, konnte z.B. am *KIICL1*-Promotor in *K. lactis*, am *PpAOX1*-Promotor in *P. pastoris* sowie für Gene des TCA-Zyklus in *E. coli* gezeigt werden (Eppler *et al.*, 2002; Rodicio *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). Letzteres steht allerdings im Zusammenhang mit dem bakterien-spezifischen Phosphotransferase-System und ist daher nicht auf Hefen übertragbar (Review: Deutscher *et al.*, 2006). Ein Glycerol-Repressionseffekt erklärt höchstwahrscheinlich auch die im Vergleich zu Ethanol abgeschwächte Induktion der Gene des Glyoxylat-Zyklus (Vergleich Abbildung 12 und Abbildung 13). Unabhängig davon, wie diese Stoffwechselwege induziert werden, dienen sie in erster Linie der Synthese von Acetyl-CoA und der Bereitstellung von C4-Körpern für die Gluconeogenese, um biosynthetische Prozesse und damit das Wachstum der Zelle zu ermöglichen.

Neben dieser allgemeinen Antwort auf nicht-fermentierbare Kohlenstoffe zeichneten sich in den *Microarray*-Analysen allerdings auch ethanol- und glycerolspezifische Unterschiede im *K. lactis*-Transkriptom ab. In Ethanol sind die Transkriptlevel vieler Gene der Glykolyse, des PPP sowie einiger zentraler Komponenten der Atmungskette reduziert. Außerdem werden zahlreiche Genprodukte der rRNA- und Proteinsynthese als auch von Prozessen, die mit

logarithmischem Wachstum in Verbindung stehen (DNA-Synthese und DNA-Replikation, Zellwachstum und Proliferation), auf Transkriptionsebene reduziert (Abbildung 10 und Abbildung 11). Das verdeutlicht, dass in *K. lactis* auch nach zwei-stündigem *Shift* in Ethanol viele energieverbrauchende Prozesse reduziert sind. Somit kann die beschränkt verfügbare Energie in die Adaption an die neuen Umweltbedingungen fließen. In Untersuchungen von Thompson *et al.* (2013) zu transkriptomweiten Veränderungen der Genexpression in *K. lactis* während des diauxischen *Shifts* konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die Limitierung von Glukose führte dort ebenso zu einer starken Repression von Genen der Transkription und Translation und einer starken Induktion von Genen des Kohlenstoffmetabolismus und offenbart somit viele Gemeinsamkeiten zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Beim Vergleich dieser Daten sollte jedoch immer berücksichtigt werden, dass es physiologisch gesehen wahrscheinlich einen großen Unterschied macht, ob die Zellen sich langsam an verarmende Glukose-Bedingungen adaptieren können, wie es beim diauxischen *Shift* der Fall ist, oder ob sie, wie bei einem *Shift*-Experiment in dieser Arbeit, aus ihrer logarithmischen Wachstumsphase gerissen werden und sich rapide auf neue Umweltbedingungen anpassen müssen. Das experimentelle Design in dieser Arbeit wurde absichtlich so gewählt, um in den Zellen die primäre Antwort auf Glukose-Entzug untersuchen zu können. Zudem ist in *Shift*-Experimenten ein definierter Bezugspunkt gegeben. Die Zugabe von Ethanol diente in früheren Untersuchungen dazu, dass den Zellen eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, damit Translationsprozesse nicht komplett eingestellt werden. Erst später stellte sich heraus, dass die Verwertung von Ethanol und Glycerol zum Teil unterschiedlich reguliert wird (Mehlgarten *et al.*, 2015), weshalb in dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen mit den beiden C-Quellen durchgeführt wurden.

Bemerkenswert ist, dass in Glycerol im Gegensatz zu Ethanol keine Reduzierungen der Transkriptlevel von Genen der rRNA- und Proteinsynthese stattfinden. Nach zweistündigem Wachstum in Glycerol ist sogar ein Anstieg vieler ribosomaler Protein (rp)-mRNAs zu verzeichnen (Abbildung 10). In *S. cerevisiae* konnte hingegen gezeigt werden, dass ein *Shift* von Glukose zu Glycerol bereits nach 10 Minuten zur globalen Repression der Translation führt und über 50% aller rp-mRNAs reduziert sind (Kuhn *et al.*, 2001). Die hier gewonnenen Daten geben einen Hinweis darauf, dass sich *K. lactis* relativ schnell (innerhalb von zwei Stunden) an die Verwertung von Glycerol anpassen und diese Kohlenstoffquelle



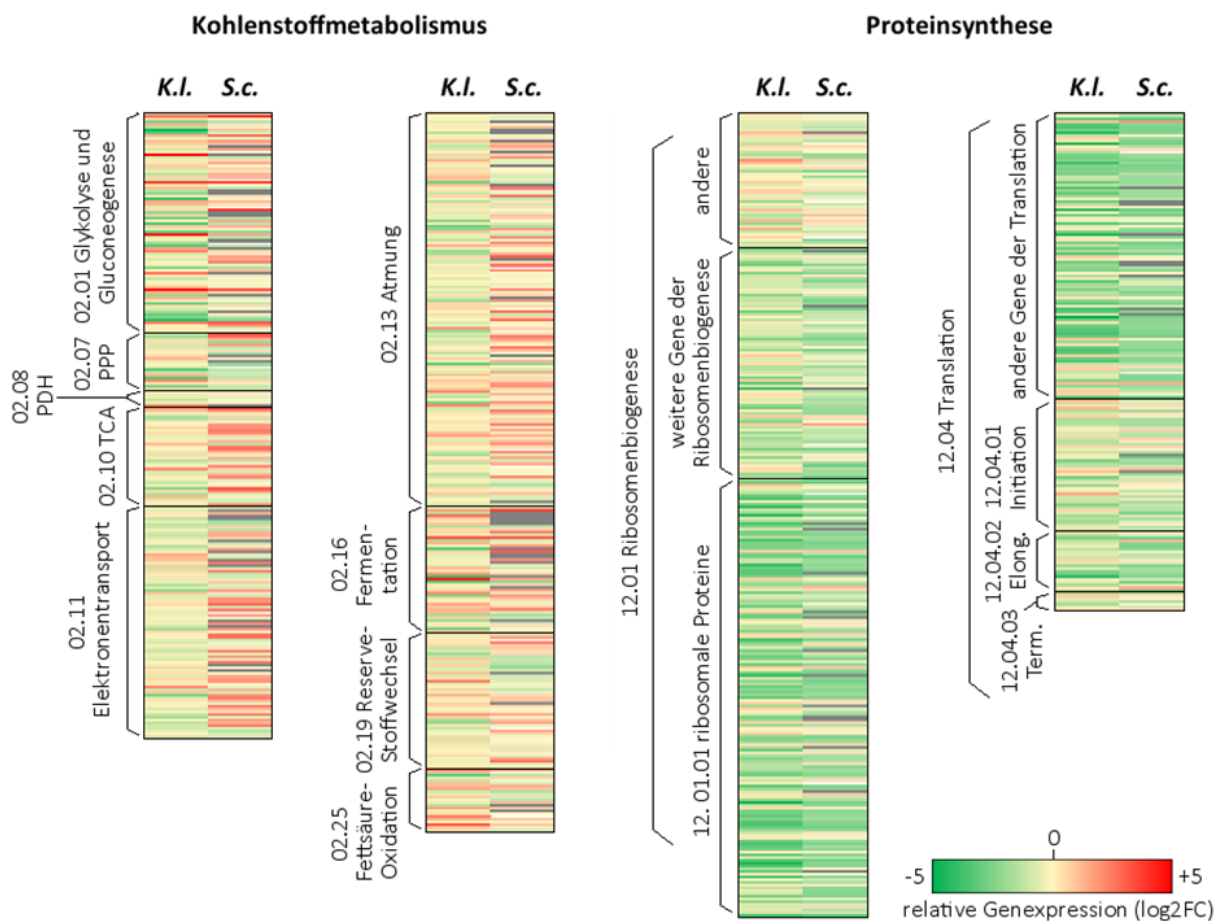
energiegewinnend nutzen könnte. Dadurch können energieverbrauchende Prozesse wie die Proteinsynthese wieder hochgefahren und die Expression dafür benötigter Gene induziert werden. Bei der Verwertung von Glycerol werden Gene des Methylcitrat-Zyklus besonders stark induziert (Abbildung 13). Diese Gegebenheit sticht vor allem deshalb hervor, weil vier Gene (*KICHA1*, *KIPDH1*, *KICIT3*, *KIICL2*), die in diesen Stoffwechselweg involviert sind, zu den am stärksten induzierten Genen der gesamten *Microarray*-Analyse zählen. Wie bereits erwähnt, werden die Gene des Methylcitrat-Zyklus in Ethanol nicht annähernd so stark induziert. In Glycerol wird Propionyl-CoA, ein Schlüsselmetabolit des Methylcitrat-Zyklus, vermutlich zusätzlich durch den Abbau von Threonin gewonnen. Zumindest ist die Expression von *KICHA1*, einer Serin/Threonin-Dehydratase, in Glycerol, nicht aber in Ethanol, gesteigert. Propionyl-CoA ist jedoch toxisch für die Zelle, da es vermutlich eine Untereinheit des PDH-Komplexes hemmt (Brock und Buckel, 2004; Graybill *et al.*, 2007). Die starke Induktion der Gene des Methylcitrat-Zyklus dient der Zelle daher wahrscheinlich primär zur Detoxifizierung, indem Propionyl-CoA weiter verstoffwechselt wird. Auch in anderen Hefen wie *S. cerevisiae* und *Fusarium solani* führt das Wachstum auf Kohlenstoffquellen, die Propionyl-CoA generieren, zur starken Induktion der Methylcitrat-Synthase (Graybill *et al.*, 2007; Domin *et al.*, 2009). Der Methylcitrat-Zyklus liefert außerdem Succinat und Pyruvat, die in den TCA-Zyklus und in die Gluconeogenese einfließen können. Da die Gene dieses Stoffwechselwegs hochgradig induziert werden, ist der Methylcitrat-Zyklus wahrscheinlich sehr bedeutend für den Metabolismus von *K. lactis* bei Wachstum in Glycerol. Es ist jedoch allgemein bekannt, dass Transkriptlevel nicht zwingend die vorherrschenden Proteinlevel in der Zelle widerspiegeln (Vogel und Marcotte, 2012). Weiterführende Analysen müssten daher klären, wie groß die tatsächliche Relevanz des Methylcitrat-Zyklus für das Wachstum von *K. lactis* in Glycerol ist und ob nicht nur die mRNA- sondern auch die Proteinmenge darin beteiligter Enzyme erhöht ist. Zudem wäre es aufschlussreich zu wissen, ob und inwiefern der Abbau von Threonin oder die Verwertung von ungeradzahligen Fettsäuren die Propionyl-CoA-Konzentration in der Zelle durch glycerol-haltiges Medium tatsächlich steigern.

#### **4.2. Unterschiede zur Verwertung von Ethanol in *K. lactis* und *S. cerevisiae***

Interessant ist nun auch der Vergleich der gewonnenen Expressionsdaten der Crabtree-negativen Spezies *K. lactis* mit Daten der Crabtree-positiven Hefe *S. cerevisiae*, um zu analysieren, inwieweit die unterschiedliche Physiologie der Zellen Einfluss auf die transkriptionelle Adaption des Stoffwechsels an Ethanolverwertung nimmt. Für diesen

Vergleich wurden Transkriptomdaten von DeRisi und Kollegen (1997) herangezogen, die erstmals transkriptomweit Veränderungen der Genexpression während des diauxischen *Shifts* verfolgten. Auch hier müssen sich die Zellen nach Verbrauch der Glukose auf die Verwertung von Ethanol umstellen.

Die vergleichende Darstellung ist jedoch nicht so einfach, da beide Untersuchungen unterschiedliche experimentelle Designs aufweisen. Man kann jedoch zumindest davon ausgehen, dass sich die Zellen in beiden Versuchsansätze in einer lag-Phase befinden, in der Wachstumsprozesse reduziert werden, um den Stoffwechsel best- und schnellstmöglich an die neuen Nährstoffbedingungen adaptieren zu können (Kussell und Leibler, 2005).



**Abbildung 48: Einfluss von Ethanol in *K. lactis* und *S. cerevisiae*.**

Heatmap-Diagramm zur Darstellung relativer Transkriptlevel von Genen des Kohlenstoffmetabolismus und der Proteinsynthese nach einem zweistündigen Shift von Glukose auf Ethanol in *K. lactis* (*K.l.*) und in der post-diauxischen *Shift*-Phase (zwei Stunden nach diauxischem *Shift*) in *S. cerevisiae* (*S.c.*). Differenziell exprimierte Gene sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: grün = herunter reguliert ( $\log_2FC \leq -1$ ), rot = hoch reguliert ( $\log_2FC \geq +1$ ), grau = kein homologes Gen in *S. cerevisiae* vorhanden. Die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen erfolgte nach MIPS-Kategorisierung mit Hilfe der FunCat Datenbank. PPP: Pentosephosphatweg; PDH: Pyruvatdehydrogenase-Komplex; TCA: Citrat-Zyklus; Elong.: Elongation; Term.: Termination. Die Daten für *S. cerevisiae* stammen von DeRisi *et al.*, 1997.

Dies spiegelt sich zumindest in beiden Hefen in einer umfangreichen Reduzierung der Expression von Genen wider, die mit Ribosomenbiogenese und Translation in Verbindung stehen (Abbildung 48). Allerdings korreliert die Dauer der diauxischen und der *Shift*-lag-Phase nicht immer miteinander (New *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), weshalb die Veränderung zellulärer Prozesse während dieser beiden Transitionsphasen vermutlich unterschiedlich ablaufen und man nur vorsichtig Vergleiche anstellen sollte. Der Vergleich der Transkriptomdaten beider Hefen zeigt deutliche Unterschiede bei der Expression von Genen kohlenstoffmetabolischer Prozesse (Abbildung 48). In *K. lactis* werden vor allem Gene der Glykolyse und Gluconeogenese differentiell exprimiert, von denen der überwiegende Teil reduzierte Transkriptlevel nach dem *Shift* aufweist. In *S. cerevisiae* hingegen beinhaltet dieser Prozess einen großen Teil von DEGs mit induzierter Genexpression. Die relativen Expressionslevel sagen jedoch nichts über die absoluten Transkriptmengen in der Zelle aus, sondern geben lediglich das Verhältnis zwischen mRNA-Menge in Glukose und in Ethanol bzw. vor und nach dem diauxischen *Shift* wieder. Die hier beobachteten Unterschiede könnten also damit erklärt werden, dass in *K. lactis* das basale Transkriptionslevel in Glukose bereits hoch genug ist, um dem Stoffwechsel an Ethanolverwertung zu adaptieren und dass diejenigen Gene, die für die Glukose-Verwertung nicht benötigt werden, herunter reguliert werden. Im Gegensatz dazu ist in *S. cerevisiae* die Glukose-Repression stark ausgeprägt, weshalb zahlreiche Gene, die für die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe unverzichtbar sind, während des diauxischen *Shifts* erst induziert werden müssen (Klein *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2002).

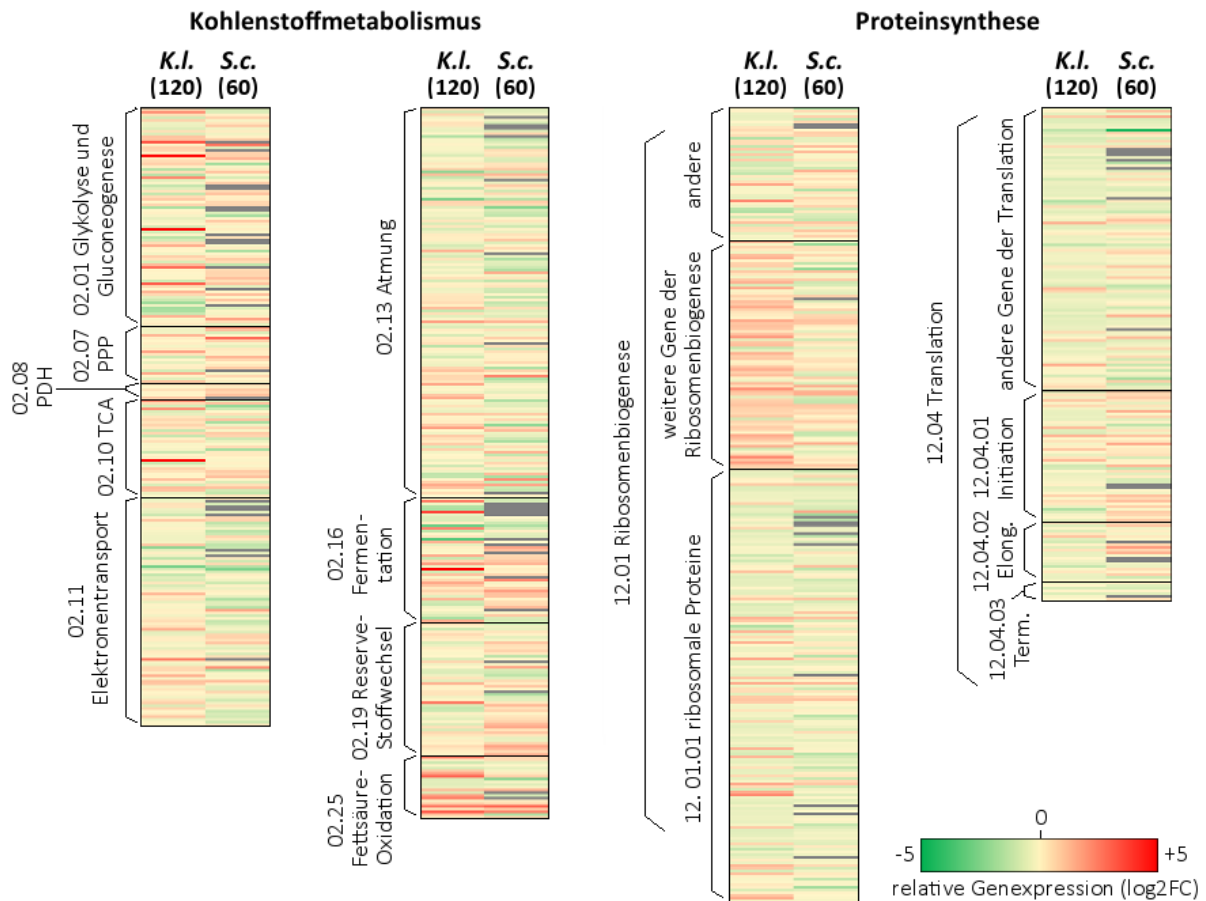
Ein weiterer deutlicher Unterschied zeichnet sich für Gene des TCA-Zyklus, des Elektronentransports und der Atmung ab, deren Transkriptlevel in *S. cerevisiae* induziert werden, um die Umstellung von Fermentation von Glukose auf Respiration von Ethanol zu ermöglichen. Hier zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zu *S. cerevisiae* ab, denn die Expression dieser Gene in *K. lactis* ist überwiegend unverändert oder sogar reduziert, was vermutlich mit der Crabtree-negativen Lebensweise im Zusammenhang steht (Abbildung 48): *K. lactis* betreibt einen respiro-fermentativen Stoffwechsel, wobei unter aeroben Bedingungen die Atmung dominiert. Gene der Atmung sind daher bereits in Anwesenheit von Glukose exprimiert (Mulder *et al.*, 1995) und müssen bei einem *Shift* auf Ethanol nicht induziert werden. Thompson *et al.* (2013) konnten jedoch zeigen, dass auch in *K. lactis* die Gene der Atmung während des diauxischen *Shifts* induziert werden, auch wenn dies im

Vergleich zu *S. cerevisiae* verzögert geschieht. Möglicherweise erfordert die Induktion respiratorischer Gene in Ethanol die Umstellung des Stoffwechsels auf Ethanol-Verwertung.

#### **4.3. Unterschiede zur Verwertung von Glycerol in *K. lactis* und *S. cerevisiae***

Der Vergleich der Transkriptomdaten aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* konnte bereits deutliche Unterschiede in der transkriptionellen Regulation kohlenstoffmetabolischer Gene aufzeigen (Abbildung 48). Doch handelt es sich dabei um einen spezifischen Effekt durch die Umstellung auf Ethanolverwertung, oder führt die Nutzung von Glycerol zu ähnlichen Unterschieden zwischen den beiden Hefen? Um dies zu beantworten, wurde die Expressionsdaten von *K. lactis* mit Daten für *S. cerevisiae* verglichen, bei denen *S. cerevisiae*-Zellen für 60 Minuten mit einem *Shift* von Glukose in glycerolhaltiges Medium überführt wurden (Roberts und Hudson, 2006).

Vergleicht man Gene der Kategorie Proteinsynthese miteinander, so fällt auf, dass bei einem *Shift* in Glycerol in beiden Hefen keine so dramatische Reduktion der Transkriptlevel zu beobachten ist, wie es für einen *Shift* in Ethanol detektiert werden konnte. In *S. cerevisiae* kommt es nur zum leichten Absenken der Transkriptlevel von Genen der Proteinsynthese. Dagegen ist in *K. lactis* sogar eine Induktion vieler Gene, vor allem der Ribosomenbiogenese, zu verzeichnen, was einen deutlichen Unterschied zu *S. cerevisiae* darstellt (Abbildung 49). Diese Beobachtung könnten damit begründet werden, dass in beiden Hefen Wachstumsprozesse nach einem *Shift* in Glycerol im Gegensatz zu Ethanol nicht so gravierend oder sogar gar nicht reduziert werden. Wenn die Zellen jedoch ihren Stoffwechsel an die Verwertung von Glycerol anpassen, was sowohl für *S. cerevisiae* als auch für *K. lactis* gleichermaßen mit Veränderungen der Expression von z.B. Genen der Glykolyse, der Gluconeogenese und der Fettsäure-Oxidation einhergeht (Abbildung 49), werden in *K. lactis* kern-codierte Gene der Atmungskette leicht induziert, die in *S. cerevisiae* leicht reduzierte Expressionslevel aufweisen. Da in *K. lactis*, aber nicht in *S. cerevisiae*, nach dem *Shift* eine Induktion von Genen der Ribosomenbiogenese sowie der Atmung auftritt, könnte man zu der Annahme kommen, dass sich *K. lactis* schneller an glycerol-respiratorisches Wachstum anpassen kann als *S. cerevisiae*. Man sollte jedoch anhand von Transkriptomdaten nicht zwingend Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Zelle ziehen. Daher wäre die Analyse von Stoffwechsel- und Wachstumsraten hilfreich, um die Adaptionsgeschwindigkeit der beiden Hefen auf glycerol-respiratorisches Wachstum zu ermitteln.



**Abbildung 49: Einfluss von Glycerol in *K. lactis* und *S. cerevisiae*.**

Heatmap-Diagramm zur Darstellung relativer Transkriptlevel von Genen des Kohlenstoffmetabolismus und der Proteinsynthese nach einem zweistündigen *Shift* von Glukose auf Glycerol in *K. lactis* (*K.l.*) bzw. nach einem einstündigem *Shift* in *S. cerevisiae* (*S.c.*). Differenziell exprimierte Gene sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: grün = herunter reguliert ( $\log_2FC \leq -1$ ), rot = hoch reguliert ( $\log_2FC \geq +1$ ), grau = kein homologes Gen in *S. cerevisiae* vorhanden. Die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen erfolgte nach MIPS-Kategorisierung mit Hilfe der FunCat Datenbank. PPP: Pentosephosphatweg; PDH: Pyruvatdehydrogenase-Komplex; TCA: Citrat-Zyklus; Elong.: Elongation; Term.: Termination. Die Daten für *S. cerevisiae* stammen von Roberts und Hudson (2006).

Prinzipiell gesehen ähneln sich *K. lactis*, *S. cerevisiae* sowie andere Spezies der Ascomycota im Repertoire metabolischer Prozesse, die den Organismen als Antwort auf sich verändernde Nährstoffbedingungen zur Verfügung stehen (Thompson *et al.*, 2013). Die divergente Entwicklung der zugrunde liegenden genregulatorischen Netzwerke (GRNs) ermöglichte jedoch die Entstehung verschiedener Lebensweisen (z.B. respiro-fermentativ bei *S. cerevisiae* und *S. pombe*) oder umgekehrt, weshalb dieses Repertoire unterschiedlich genutzt wird. Im Fall der Respiration ermöglichten so z.B. der Verlust antinukleosomaler und regulatorischer Promotor-Sequenzen (RGE-Element) auf der einen Seite (Ihmels *et al.*, 2005; Tsankov *et al.*, 2010) und Gen- und/oder Genomduplikationen auf der anderen Seite das Evolvieren des GRNs der Atmung (Conant und Wolfe, 2007; Thompson *et al.*, 2013). Sobald eine präferierte

Nahrungsquelle wie Glukose aufgebraucht ist und andere Kohlenstoffquellen erschlossen werden müssen, ist aber letztlich entscheidend, dass die Adaption des Stoffwechsels dem Organismus einen Fitness-Vorteil liefert. Dabei geht es jedoch nicht ausschließlich darum, den Metabolismus schnellstmöglich umzustellen, sondern eine Abstimmung (*trade-off*) zwischen schneller Anpassung und schnellem Wachstum zu finden (Chu und Barnes, 2016).

Der *Shift* von Glukose zu Glycerol ist in *K. lactis* durch eine sehr starke Induktion der Transkriptlevel von Genen des Methylcitrat-Zyklus gekennzeichnet (Abbildung 13). Daher ist es höchst interessant zu analysieren, ob dieser Stoffwechselweg auch in *S. cerevisiae* durch Glycerol besonders stark induziert wird. Der Methylcitrat-Zyklus dient vermutlich hauptsächlich der Detoxifizierung von Propionyl-CoA in der Zelle, dass durch die Verwertung von einigen Aminosäuren wie Threonin oder ungeradzahlige Fettsäuren entsteht. Dieser Mechanismus ist in vielen Mikroorganismen konserviert und die Induktion von Genen des Methylcitrat-Zyklus konnte auch in verschiedenen Spezies der *Saccharomyces*-Klade gezeigt werden (Tabelle 12). Aus der Gegenüberstellung dieser Daten wird ersichtlich, dass der Grad der Induktion sowohl von der Spezies als auch von den ausgewählten Wachstumsbedingungen abhängig ist.

**Tabelle 12: Kohlenstoffquellen-abhängige Induktion von Genen des Threonin-Abbaus und des Methylcitrat-Zyklus in Spezies der *Saccharomyces*-Klade.**

Spezies (Wachstumsbedingungen)	relativer Expressionslevel (FC)			
	<i>CHA1</i>	<i>CIT3</i>	<i>PDH1</i>	<i>ICL2</i>
<i>K. lactis</i> (120 min nach <i>Shift</i> in Glycerol) <sup>a</sup>	71	555	34	169
<i>K. lactis</i> (120 min nach <i>Shift</i> in Ethanol) <sup>a</sup>	0,8	9	16	26
<i>K. marxianus</i> (kontinuierlich* in Xylose) <sup>b</sup>	0,6	294	28	32
<i>A. gossypii</i> (nach diaux. <i>Shift</i> ) <sup>c</sup>	n.s.	4	29	n.s.
<i>S. cerevisiae</i> (60 min nach <i>Shift</i> in Glycerol) <sup>d</sup>	1,7	1,0	1,6	1,2
<i>S. cerevisiae</i> (120 min nach diaux. <i>Shift</i> in Ethanol) <sup>e</sup>	3	3	10	7
<i>S. cerevisiae</i> (kontinuierlich* in Glycerol) <sup>d</sup>	0,5	30	30	4
<i>S. cerevisiae</i> (kontinuierlich* in Ethanol) <sup>d</sup>	0,7	21	37	3
<i>C. glabrata</i> (120 min nach Phagozytose) <sup>f</sup>	n.s.	80	74	24

Relative Expressionslevel von Genen des Threonin-Abbaus und Methylcitrat-Zyklus verschiedener Spezies der *Saccharomyces*-Klade (*K. lactis*, *K. marxianus*, *A. gossypii*, *S. cerevisiae* und *C. glabrata*) unter angegebenen Wachstumsbedingungen. \* Bei kontinuierlichem Wachstum erfolgt die Relation zu einer parallel angezogenen Kultur in Glukose. n.s. = nicht signifikant. <sup>a</sup> diese Arbeit, <sup>b</sup> Schabort et al., 2016, <sup>c</sup> Rischatsch, 2007, <sup>d</sup> Roberts und Hudson, 2006, <sup>e</sup> DeRisi et al., 1997, <sup>f</sup> Kaur et al., 2007.

Sehr wahrscheinlich haben sich die Mechanismen, die die Induktion des Methylcitrat-Zyklus regulieren, in vielen Organismen in Anpassung an ihren natürlichen Lebensraum divergent entwickelt. Die beiden *Kluyveromyces*-Arten zeigen unter bestimmten Bedingungen (*K. lactis* in Glycerol, *K. marxianus* in Xylose) eine sehr starke Induktion der Citrat-Synthase, was in *S. cerevisiae* und *A. gossypii* nicht der Fall ist. *C. glabrata* zeigt ebenfalls eine starke Induktion von *CgCIT3*, wobei der Methylcitrat-Zyklus in *Candida*-Arten nicht der Detoxifizierung von Propionyl-CoA sondern vielmehr der Verwertung von Aminosäuren nach Phagozytose durch Makrophagen dient (Pan, 2011; Otzen *et al.*, 2014). Dabei handelt es sich bei *C. glabrata* um eine sehr spezielle Anpassung an den natürlichen Lebensraum als humanes Pathogen, die von anderen Hefen der *Saccharomyces*-Klade abgegrenzt werden muss. Die starke Induktion des Methylcitrat-Zyklus bei *K. lactis* und *K. marxianus* könnte damit zusammen hängen, dass in Milchfett, einem natürlichen Habitat dieser Hefen, ein bestimmter Prozentsatz an ungeradzahligen Fettsäuren enthalten ist (ca. 2% Hepta- und Pentadekansäure; Kusche *et al.*, 2015) und die beiden Hefen daher „von Haus aus“ mit höheren intrazellulären Propionyl-CoA-Konzentrationen umgehen müssen und sich entsprechend angepasst haben. Möglicherweise unterscheiden sich die beiden *Kluyveromyces*-Spezies von *S. cerevisiae* und *A. gossypii* auch dahingehend, welche Fettsäuren in der Hefe synthetisiert werden. Leider konnten keine Daten ausfindig gemacht werden, die den Anteil ungeradzahliger Fettsäuren in Hefen beziffern, zumal die Komposition der Fettsäuren in Hefen in Abhängigkeit der Nährstoffversorgung und sogar zwischen Individuen einer Art stark schwanken kann (Ratledge und Evans, 1993).

Festhalten kann man, dass die ausgesprochen starke Induktion von Genen des Methylcitrat-Zyklus auf transkriptioneller Ebene durch Glycerol in *K. lactis*, nicht aber in *S. cerevisiae*, auftritt. Dazu kommt, dass abgesehen von dieser Arbeit in keiner der in Tabelle 12 aufgeführten Studien eine so starke Induktion von Genen des Threonin-Abbaus (*CHA1*) beobachtet werden konnte. Daher ist der enorme Anstieg der Transkriptlevel von Genen des Methylcitrat-Zyklus anscheinend die Konsequenz eines erhöhten Threonin-Katabolismus, der durch die Verwertung von Glycerol in *K. lactis* induziert sein könnte. Die Regulation von *ScCHA1* erfolgt in *S. cerevisiae* durch den TF *ScCha4* und wird durch die Nukleosomenstruktur am Promotor beeinflusst (Holmberg und Schjerling, 1996; Sabet *et al.*, 2003). Die *ScCHA1*-Expression wird durch Serin oder Threonin als alleinige Stickstoffquelle induziert, unterliegt jedoch der Katabolitrepression durch hochwertigere Stickstoffquellen

wie Ammonium oder Asparagin (Bornaes *et al.*, 1993). In *K. lactis* existiert auch ein potentiell *ScCHA4*-Homolog (*KLLAOF19602g*), dessen Expression jedoch in Glycerol im Vergleich zu Glukose nicht verändert ist (Tabelle A8). Entweder wirkt in *K. lactis* Glycerol induzierend auf die *KICHA1*-Expression oder aber das Wachstum auf Glycerol führt zu einer Verarmung an hochwertigeren Stickstoffquellen, wodurch die Katabolitrepression am *KICHA1*-Promotor aufgehoben und die Transkription induziert werden könnte.

#### 4.4. Untersuchungen zum Transkriptionsfaktor *KIAdr1*

Der Transkriptionsfaktor *Adr1* ist in *S. cerevisiae* ein wichtiger Regulator vieler Gene, die für die Verwertung von Ethanol, Glycerol und Fettsäuren eine Rolle spielen. Um die Bedeutung von *Adr1* in *K. lactis* hinsichtlich transkriptioneller Regulation kohlenstoffmetabolischer Gene zu charakterisieren, wurden phänotypische Untersuchungen als auch Expressionsanalysen durchgeführt. Anhand von Komplementationsanalysen wurde zunächst die Annotation des Locus *KLLAOF13046g* als tatsächliches Homolog von *ScADR1* bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass *KIAdr1* *ScAdr1* funktionell ersetzen kann (Abbildung 15). Später durchgeführte Untersuchungen von *KIAdr1* in *S. cerevisiae* zeigten jedoch, dass die Induktion von *ScADH2* durch *KIAdr1* weniger stark vermittelt wird als durch *ScAdr1* (Abbildung 26). Dies konnte auch in Untersuchungen von Cardarelli *et al.* (2016), die erst kurz vor Abschluss dieser Arbeit veröffentlicht wurden, beobachtet werden. Die Autoren vermuten, dass *KIAdr1* zwar an die gleiche Erkennungssequenz binden kann wie *ScAdr1*, das sich jedoch die TADs zwischen *K. lactis* und *S. cerevisiae* divergent entwickelt haben, weshalb die Aktivierung von *ScADH2* durch *KIAdr1* in *S. cerevisiae* weniger effektiv ist.

Die phänotypische Analyse des *Kladr1Δ*-Stammes zeigte weder einen Wachstumsdefekt auf Ethanol, Acetat, Laktat oder Glycerol noch auf Fettsäuren (Oleat und Palmitat; Abbildung 16). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Cardarelli *et al.* (2016). Der dort konstruierte *Kladr1Δ*-Stamm weist reduziertes Wachstum auf Medium mit Glycerol und Oleat auf. Die Möglichkeit, dass durch die Stammkonstruktion von *Kladr1Δ* in dieser Arbeit eine verkürzte *Adr1*-Variante entsteht und dadurch kein Phänotyp beobachtet werden konnte, wurde durch *Western Blot*-Analysen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Phänotypen könnten aber möglicherweise auf den Stammhintergrund zurückzuführen sein. Der in dieser Arbeit verwendete JA6-Stamm weist eine für *K. lactis* verhältnismäßig starke Glukose-Repression auf, die in anderen *K. lactis*-Stämmen nicht oder



nur schwach ausgeprägt ist (Breunig *et al.*, 2000). Daher könnte die Abhängigkeit von *KIAdr1* stammspezifisch unterschiedlich sein. Die Anwesenheit von *KIAdr1* könnte sich zwar nach wie vor positiv auf die Genexpression *KIAdr1*-abhängiger Gene auswirken, doch die Deletion von *KIADR1* würde dann nicht zwingend zu einem Wachstumsdefizit führen.

#### **4.4.1. Die Bedeutung von *KIAdr1* für den Kohlenstoffmetabolismus auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen**

Anhand von vergleichenden Expressionsanalysen zwischen Wildtyp und *Kladr1Δ* konnte der Einfluss von *KIAdr1* auf das Wachstum auf Glycerol und Ethanol untersucht und *KIAdr1*-abhängig regulierte Gene identifiziert werden. Dabei konnten zwei wesentliche Dinge festgestellt werden: I) Der Einfluss von *KIAdr1* auf die transkriptomweite Genexpression in *K. lactis* ist sehr gering und II) in Glycerol minimal größer als in Ethanol. Lediglich 47 (entspricht 0,95%) bzw. 23 (entspricht 0,47%) aller untersuchten Gene in *Kladr1Δ* zeigten bei Wachstum auf Glycerol bzw. Ethanol ein Expressionslevel, das im Vergleich zum Wildtyp mindestens 2-fach erhöht oder erniedrigt ist.

Aus diesen Expressionsdaten geht hervor, dass *KIAdr1* positiv an der Regulierung der Expression von *KIACS1*, von Genen des TCA- bzw. Methylcitrat-Zyklus (*KICIT3*, *KIICL2*) und der Fettsäure-Oxidation (*KIPOX1*, *KIFOX2*, *KIFAA2*, *KIPOT1*) beteiligt ist. Diese Gene werden sowohl in Ethanol als auch in Glycerol positiv von *KIAdr1* beeinflusst. Daher handelt es sich wahrscheinlich um eine generelle, *KIAdr1*-abhängige Induktion einiger Gene, die für die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe benötigt werden. Die reduzierte Expression von *KICIT3* und *KIICL2* spricht zudem dafür, dass *KIAdr1* auch eine Rolle für die Detoxifizierung von Propionyl-CoA spielt. In *S. cerevisiae* werden diese Gene ebenfalls positiv von *ScAdr1* reguliert (Tabelle 13; Young *et al.*, 2003). Daher könnte es sich um ein Set an Genen handeln, das bereits in einem gemeinsamen Vorfahren *Adr1*-abhängig war und dessen Regulierung aufgrund seiner Relevanz für den Hefe-Stoffwechsel bis heute beibehalten wurde.

Neben diesem generellen Einfluss hat *KIAdr1* außerdem einen kohlenstoffquellen-spezifischen Einfluss auf die Expression einiger Gene. Hier wirkt *KIAdr1* allerdings nicht nur aktivierend auf Genexpression, sondern hat zudem eine wichtige Rolle als negativer Regulator.

Tabelle 13: Adr1-abhängige Gene in *K. lactis* und *S. cerevisiae* (Auszug)

Gen in <i>K. lactis</i>	Gen in <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>	<i>K. lactis</i>		Bedeutung für
			Glyc	EtOH	
<b>Adr1-abhängig in <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i></b>					
<i>KLLA0A03333g</i>	<i>ACS1</i>	0,11	0,25 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	Ethanol-Verwertung
<i>KLLA0F00440g</i>	<i>ALD4</i>	0,18	0,90	0,37	Ethanol-Verwertung
<i>KLLA0E14235g</i>	<i>CIT3</i>	0,10	0,13	0,21	TCA-, Methylcitrat-Zyklus
<i>KLLA0E13905g</i>	<i>ICL2</i>	0,14	0,02	0,67	Methylcitrat-Zyklus
<i>KLLA0D18909g</i>	<i>SPS19</i>	0,06	0,36	0,63	Fettsäure-Oxidation
<i>KLLA0F09933g</i>	<i>POX1</i>	0,02	0,48	0,54	Fettsäure-Oxidation
<i>KLLA0E13817g</i>	<i>FOX2</i>	0,06	0,58	0,56	Fettsäure-Oxidation
<i>KLLA0B11572g</i>	<i>FAA2</i>	0,10*	0,36 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	Fettsäure-Oxidation
<i>KLLA0F10879g</i>	<i>POT1</i>	0,07	0,54 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>	Fettsäure-Oxidation
<i>KLLA0E11881g</i>	<i>ADY2</i>	0,05	0,41	0,30	Acetat-Transport
<i>KLLA0A07315g</i>	<i>TOS6</i>	2,23	0,51	0,37	Zellwandprotein
<i>KLLA0D16412g</i>	<i>INO1</i>	4,00	0,19	0,49	Inositolbiosynthese
<i>KLLA0F12760g</i>	<i>CIT2</i>	2,94	2,35 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>	Glyoxylat-Zyklus
<b>Adr1-abhängig in <i>K. lactis</i></b>					
<i>KLLA0C08107g</i>	<i>ICL1</i>	2,34 <sup>*,c</sup>	5,19 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	Glyoxylat-Zyklus
<i>KLLA0F23914g</i>	<i>MLS1</i>	3,15 <sup>*,c</sup>	3,62 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	Glyoxylat-Zyklus
<i>KLLA0B11363g</i>	-	-	2,70	0,96	Glykolyse/Gluconeo. (PFK-2)

Auszug aus Tabelle A12. Auflistung relativer Expressionslevel (FC) einiger Adr1-abhängigen Gene in *K. lactis* und *S. cerevisiae* (Expression in *adr1Δ* relativ zum WT). DEG, wenn FC ≤ 0,55 bzw. ≥ 1,95. <sup>a</sup> FC aus qRT-PCR, nicht Adr1-abhängig in *Microarray*-Analysen dieser Arbeit, <sup>b</sup> aus Young *et al.*, 2003, <sup>c</sup> nicht Adr1-abhängig in Tachibana *et al.*, 2005; \* nicht signifikant in <sup>b</sup>.

In Glycerol vermittelt *KlAdr1* beispielsweise die Repression von Genen des Glyoxylat-Zyklus und von *KLLA0F09141g*, das für eine 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFK-2) kodiert (Tabelle 13). PFK-2-Enzyme katalysieren die Synthese von Fructose-2,6-Bisphosphat, einem allosterischen Regulator von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Gluconeogenese. Viele Schritte der Glykolyse sind reversibel, wobei sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion eines Schrittes durch ein Enzym katalysiert wird. Ein irreversibler Schritt der Glykolyse ist jedoch die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat durch Phosphofruktokinase unter Verbrauch von ATP, der durch die gluconeogenese-spezifische Fructose-1,6-bisphosphatase umgekehrt wird. Diese Reaktion gilt als ein wichtiger Kontrollpunkt in der Regulation der Glykolyse (Gancedo und Serrano, 1989). Das unkontrollierte Ablaufen der Hin- und Rückreaktion hätte zur Folge, dass immer wieder Fructose-6-Phosphat entsteht, welches erneut phosphoryliert wird, wodurch der Konsum von ATP ansteigen würde. Um diesen nutzlosen Zyklus zu verhindern, unterliegen die Enzyme dieser Reaktion u.a. der

allosterischen Regulation. Fructose-2,6-Bisphosphat wirkt zugleich aktivierend auf die Phosphofruktokinaseaktivität und inhibierend auf die Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase und begünstigt den Flux von Glukose durch die Glykolyse (Avigad, 1981; Müller *et al.*, 1997). Dieser Regulationsmechanismus ist stark konserviert und in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen, von Einzellern bis hin zum Menschen, vorhanden (Review: Michels und Rigden, 2006). Die Regulation der Genexpression der PFK-2-Enzyme hat daher einen wichtigen Einfluss auf die Richtung des Fluxes durch Glykolyse oder Gluconeogenese. Die *KIAdr1*-abhängige Repression von *KLLA0B11363g* (PFK-2) ist ein Hinweis darauf, dass *KIAdr1* als negativer Regulator an diesem Regulationsmechanismus beteiligt ist. In *S. cerevisiae* ist allerdings kein orthologes Gen zu *KLLA0B11363g* vorhanden, wohl aber in *S. kluyverii* (SAKLOF03740g) und *K. waltii* (Kwal\_55.21100) (<http://ygob.ucd.ie/>). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine *Adr1*-abhängige Regulierung dieses PFK-2-Gens bereits in einem gemeinsamen Vorfahren existiert hat und später in *S. cerevisiae* und anderen Saccharomycotina-Spezies verloren gegangen ist.

Auch Gene des Glyoxylat-Zyklus (*KIICL1*, *KIMLS1*, *KICIT2*) werden durch *KIAdr1* negativ reguliert. Im Wildtyp werden diese Gene in Glycerol weniger stark induziert als in Ethanol. Der durch Glycerol hervorgerufene Repressionseffekt wird auf transkriptioneller Ebene vermittelt und wurde bereits am *KIICL1*-Promotor näher untersucht. Damit Glycerol reprimierend auf die Genexpression wirkt, muss es zunächst durch die Glycerolkinase *KIGut1* phosphoryliert werden (Rodicio *et al.*, 2008). Welche Mechanismen dazu führen, dass die Repression durch Glycerol vermittelt wird, ist bisher unklar. *KIAdr1* spielt jedoch eine wichtige Rolle für die Glycerol-Repression, da die Hemmung der *KIICL1*-Promotoraktivität in Glycerol durch die Deletion von *KIADR1* fast vollständig aufgehoben wird (Abbildung 18). Die Expression der Glycerolkinase (*KIGUT1*) ist in *Kladr1Δ* allerdings nicht signifikant verschieden vom WT (Tabelle 7 und Tabelle A9), weshalb ein indirekter Effekt von *KIAdr1* über die Regulierung der *KIGUT1*-Expression und damit der Glycerolkinase-Aktivität ausgeschlossen werden kann. Ob die Gene des Glyoxylat-Zyklus gleichermaßen in *S. cerevisiae* und *K. lactis* von *Adr1* abhängig sind, kann nicht eindeutig gesagt werden, da widersprüchliche Daten für *ScICL1* und *ScMLS1* vorliegen (Tabelle 13). In dieser Arbeit konnte zumindest keine Veränderung der *ScICL1*-Expression in *Scadr1Δ* beobachtet werden (Abbildung 20), was für eine *ScAdr1*-unabhängige Regulation spricht.

Die hier aufgezeigten Gemeinsamkeiten deuten darauf hin, dass ein Teil des Adr1-regulierten Netzwerks konserviert und auch nach der Trennung der *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*-Linie erhalten geblieben ist. Doch lediglich 13 Gene werden in sowohl *K. lactis* als auch in *S. cerevisiae* durch Adr1 reguliert (Tabelle 13). Ein weit größerer Teil Adr1-abhängiger Gene hat sich in den beiden Hefen divergent entwickelt. Das betrifft u.a. Gene der Glykolyse (*ScPGI1*, *ScTPI1*, *ScENO1*), die in *S. cerevisiae*, aber nicht in *K. lactis*, von Adr1 abhängig sind, aber auch andere zelluläre Prozesse. Die Expression verschiedener Gene der Peroxisomenbiogenese wird in *S. cerevisiae* durch *ScAdr1* reguliert (Rottensteiner *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003). In *K. lactis* hingegen kann lediglich ein einziges DEG (*KIPEX25*, kodiert für peroxisomales Membranperoxin; Tabelle A12) der Peroxisomenbiogenese zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu ist *KIAdr1* in *K. lactis* an der Regulation der Ribosomenbiogenese beteiligt (Tabelle A12), einem Prozess, mit dem *ScAdr1* in *S. cerevisiae* nicht in Verbindung gebracht wird. Die Bedeutung von Adr1 hat sich demnach in beiden Hefen sehr unterschiedlich entwickelt. Die divergente Entwicklung des Adr1-Netzwerks könnte durch Veränderungen in *cis*-regulatorischen Promotorsequenzen aufgetreten sein. Variationen dieser Art konnten bereits für zahlreiche TFs gezeigt werden, z.B. bei *Ste12* und *Tec1* zwischen nah verwandten *Saccharomyces*-Arten (Borneman *et al.*, 2007). Weiterhin wäre möglich, dass die Rolle von Adr1 durch einen anderen TF übernommen wurde. Analysen zur Regulation des Galaktosemetabolismus in *C. albicans* haben ergeben, dass die dafür benötigten Gene nicht wie in *S. cerevisiae* oder *K. lactis* durch *CaGal4* sondern durch andere TFs, *CaRgt1-Rgt3* und möglicherweise auch *CaCph1*, reguliert werden (Martchenko *et al.*, 2007; Dalal *et al.*, 2016).

Adr1-Homologe sind in vielen Hefen anzutreffen ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Die Proteinstruktur ist nicht nur innerhalb der DNA-Bindedomäne (außer bei *K.s waltii*) sondern auch über gewisse Bereiche der Transkriptionsaktivierungsdomänen von *K. lactis* bis *A. nidulans* konserviert (Abbildung A3). Das C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Bindemotiv an sich ist hoch konserviert und in vielen verschiedenen TFs bis hin zu Säugern anzutreffen. Über die Bedeutung von Adr1 in Hefen jenseits von *S. cerevisiae* ist leider nur wenig bekannt. In *Aspergillus nidulans* ist *AmdX* an der Regulation von *AmdS*, einem Gen des Acetamid-Katabolismus, beteiligt (Murphy *et al.*, 1997) und das Adr1-Homolog *rst2* von *S. pombe* reguliert die *fbp1*- und *ste11*-Expression (Kunitomo *et al.*, 2000; Higushi *et al.*, 2002). Hierbei wird einmal mehr deutlich, dass sich das Adr1-Netzwerk auseinander entwickelt hat.

#### 4.4.2. *KIAdr1* und *KISip4* co-regulieren Gene des Kohlenstoffmetabolismus

Das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren ermöglicht es der Zelle, auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren und ein definiertes Set an Genen zu regulieren. Kombinatorische Genregulation durch verschiedene TFs erhöht die Komplexität von Signalnetzwerken und ermöglicht es, verschiedene Signalwege aufeinander abgestimmt zu steuern. Auch *ScAdr1* ist in *S. cerevisiae* an kombinatorischer Kontrolle involviert. Dazu gehören u.a. das bereits erwähnte Regulon der Peroxisomenbiogenese und Fettsäure-Oxidation gemeinsam mit *ScOaf1/ScPip2* (Ratnakumar und Young, 2010) und die Expression von Genen zur Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe zusammen mit *ScCat8* (Tachibana *et al.*, 2005). In *K. lactis* hat sich jedoch das *Cat8-Sip4-Snf1*-Signalnetzwerk, das für die Regulation von Genen bei Glukosemangel benötigt wird, divergent entwickelt. Es hat sich gezeigt, dass nicht mehr *KICat8* sondern *KISip4* essentiell für die Aktivierung einiger Glukose-reprimierter Gene durch Bindung an CSRE-enthaltene Promotoren ist und *KICat8* partiell ersetzen kann (Rodicio *et al.*, 2008; Mehlgarten *et al.*, 2015). Die Expressionsanalyse der *Kladr1Δ*-Mutante ergab, dass einige durch *KISip4* regulierte Gene auch *KIAdr1*-abhängig sind. Daher wurde in dieser Arbeit eine mögliche Co-Regulation durch die beiden TFs in *K. lactis* näher untersucht (Tabelle 8).

Die Analyse der *Kladr1Δ*- und *KIsip4Δ*-Einzel- sowie der *Kladr1Δsip4Δ*-Doppelmutante ergab, dass tatsächlich einige der hier untersuchten Gene durch *KIAdr1* und *KISip4* co-reguliert werden. Das betrifft zum einen *KIICL1*, *KIMLS1* und *KICIT2*, Gene des Glyoxylat-Zyklus, deren Expression durch *KISip4* sowohl in Ethanol als auch in Glycerol induziert und durch *KIAdr1* in Glycerol reprimiert wird. Die beiden TFs wirken hier antagonistisch auf die Genexpression. Dabei wurde außerdem deutlich, dass eine *KISIP4*-Deletion epistatisch über eine *KIADR1*-Deletion ist (Abbildung 20). Diese Epistasiebeziehung verdeutlicht, dass die Aktivierungsfunktion von *KISip4* negativ durch *KIAdr1* reguliert wird. In CHIP-Analysen konnte zudem eine direkte Bindung von *KIAdr1* (Abbildung 23) und *KISip4* (Mehlgarten *et al.*, 2015) am *KIICL1*- und *KIMLS1*-Promotor gezeigt werden, weshalb man hier von einem direkten Effekt der TFs auf die Genexpression sprechen kann. Zum anderen co-regulieren *KIAdr1* und *KISip4* die Expression von Genen des Carnitin-Shuttles (*KIYAT1*, *KICAT2*, *KICRC1* und möglicherweise auch *KIYAT2*) in Glycerol sowie von *KIACS1* in Glycerol und Ethanol, wobei hier ein additiver Effekt der beiden TFs vorliegt. Ob es sich dabei um einen direkten Effekt handelt, kann bisher nicht beurteilt werden, da der Nachweis der *KIAdr1*-Bindung an den jeweiligen Promotoren

noch aussteht. Nichtsdestotrotz zeigen die Daten, dass die Co-Regulation von *ACS1* durch *Adr1* und *Cat8*, wie sie aus *S. cerevisiae* bereits bekannt ist (Kratzer und Schuller, 1997), auch in *K. lactis* erhalten geblieben ist. Aufgrund der divergenten Entwicklung des *Cat8-Sip4-Snf1*-Netzwerks in *K. lactis* hat jedoch *KISip4* die Rolle von *KICat8* übernommen. Die Erhaltung der Co-Regulation von *Adr1* und *Cat8/Sip4* spricht dafür, dass sich dieser Regulationsmechanismus während der Evolution der Hefen bewährt hat.

Anhand der hier gewonnenen Daten zu *KISip4* konnte zudem die bereits bekannte Bedeutung des TFs für die Induktion von Genen zur Verwertung nicht-fermentierbarer C-Quellen bestätigt werden. Zudem wurde in *Ksip4Δ* ein Wachstumsdefekt auf Fettsäuren festgestellt (Abbildung 19). Erklärt werden kann der verminderte Wachstum mit der Relevanz des Glyoxylat-Zyklus, dessen Gene in *K. lactis* *KISip4*-abhängig induziert werden und der für die Nutzung von Fettsäuren als Kohlenstoffquelle wichtig ist. Weiterhin wurde ersichtlich, dass *KIACS1* und *KIACS2* vermutlich unterschiedlich reguliert werden. Die Expression von *KIACS1* wird durch Ethanol, Glycerol, Acetat und Laktat *KISip4* und *KIAdr1*-abhängig induziert, wohingegen *KIACS2* ausschließlich in Ethanol durch *KISip4* aktiviert wird (Tabelle A9; Lodi *et al.*, 2001). Da im *KIACS2*-Promotor kein CSRE enthalten ist (persönliche Mitteilung C. Mehlgarten), wäre vorstellbar, dass *KISip4* in Anwesenheit von Ethanol die Expression eines weiteren TFs induziert, der die ethanol-spezifische Induktion der *KIACS2*-Expression vermittelt.

#### **4.4.3. Negative Regulation von *KISip4* durch *KIAdr1* am *KIICL1*-Promotor**

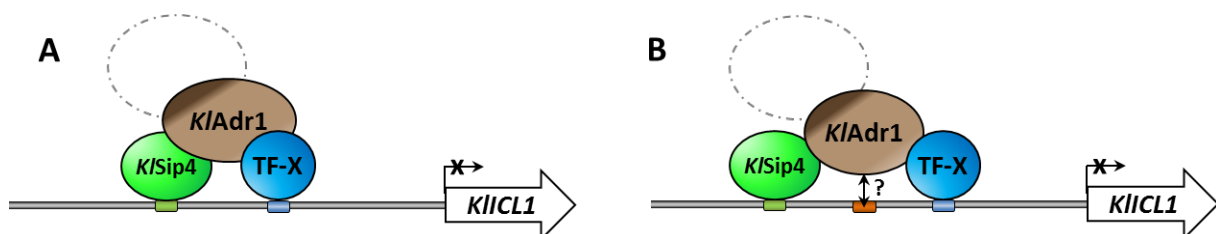
Der Transkriptionsfaktor *KIAdr1* kann in *K. lactis* Genregulation vermitteln und dabei als Aktivator oder Repressor wirken. Dieses Verhalten ist nicht einzigartig und konnte bereits in vielen anderen TFs in Hefen (z.B. *KISip4* (persönliche Mitteilung C. Mehlgarten und Tabelle 8), *ScMot3* (Martínez-Montañés *et al.*, 20013)) und höheren Eukaryoten (z.B. *TBX20* in Maus (Sakabe *et al.*, 2012); *NFY* im Mensch (Peng und Jahroudi, 2002)) beobachtet werden.

Um einen Einblick dahingehend zu bekommen, welche Mechanismen der antagonistischen Wirkung von *KIAdr1* und *KISip4* zugrunde liegen, wurde der *KIICL1*-Promotor näher untersucht. Wie bereits erwähnt, verdeutlicht die epistatische Wirkung einer *KISIP4*-Deletion über eine *KIADR1*-Deletion, dass *KIAdr1* negativ auf die Aktivierungsfunktion von *KISip4* wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass weder das *KISIP4*-Transkriptlevel noch die Proteinmenge von *KISip4* von *KIAdr1* beeinflusst werden (Abbildung 28). Zudem hat *KIAdr1*

keinen negativen Effekt auf die Bindung von *KISip4* am *KIICL1*-Promotor (Abbildung 29). Daher sollte analysiert werden, ob und inwiefern das Aktivierungspotential von *KISip4* reguliert wird und ob *KIAdr1* darauf einen Einfluss hat. Dafür wurde ein GBD-Sip4 Fusionsprotein, bestehend aus der *ScGal4*-Bindedomäne und der *KISip4*-Aktivierungsdomäne, konstruiert. Mit diesem Fusionsprotein konnte die Aktivierungsfunktion von *KISip4* unabhängig vom *KIICL1*-Promotorkontext hinsichtlich einer Abhängigkeit von *KIAdr1* untersucht werden. In diesen Analysen zeigte sich, dass die Aktivität der *KISip4*-Aktivierungsdomäne in diesem Versuchsaufbau nicht von *KIAdr1* beeinflusst wird (Abbildung 30). Die reprimierende Wirkung von *KIAdr1* auf das *KISip4*-Aktivierungspotential ist also nicht indirekt sondern wird anscheinend direkt durch die Anwesenheit von *KIAdr1* am *KIICL1*-Promotor vermittelt.

Doch bindet *KIAdr1* überhaupt direkt am *KIICL1*-Promotor? Um diese Frage zu klären, wurden ChIP-Analysen mit einem (HA)<sub>3</sub>-*KIAdr1*-Stamm durchgeführt, durch die eine Anreicherung von *KIAdr1* am *KIICL1*-, *KIMLS1*- und *KICIT2*-Promotor gezeigt werden konnte (Abbildung 23), was für einen direkten Effekt von *KIAdr1* spricht. Im Gegensatz dazu führte allerdings die Deletion der *in silico* vorhergesagten *KIAdr1*-Bindestellen im *KIICL1*-Promotor nicht zur Aufhebung der transkriptionellen Repression durch *KIAdr1* (Abbildung 24), was dagegen für einen indirekten Effekt spricht. Durch die Überexpression der *KIAdr1*-Bindedomäne (AS 18-229) im Wildtyp wurde hier gezeigt, dass die Bindung von *KIAdr1* an DNA relevant für die reprimierende Wirkung des TFs auf die Expression von *KIICL1* ist (Abbildung 25). Die *KIAdr1*-Bindedomäne konkurriert hier offensichtlich mit dem Volllängen-*KIAdr1* um die Bindung an DNA und ruft einen ähnlichen Effekt wie eine *KIADR1*-Deletion hervor. Um zu bestätigen, dass die *KIAdr1*-Wirkung an die DNA-Bindung gekoppelt ist, wurden zwei verschiedene Mutationen in der PAR-Region der DNA-Bindedomäne eingeführt, die die Bindung von *KIAdr1* stören könnten. In *S. cerevisiae* konnte sowohl für *KIAdr1*-P108L als auch für *KIAdr1*-P118L am als Reporter dienenden *ScADH2*-Promotor nachgewiesen werden, dass die DNA-Bindefähigkeit von *KIAdr1* aufgrund der Aminosäuresubstitutionen gestört ist (Abbildung 26). Doch nachfolgende Untersuchungen in *K. lactis* mit *KIAdr1*-P108L und -P118L zeigten weder für die *KIAdr1*-abhängige Repression der *KIICL1*-Promotoraktivität noch für die *KIAdr1*-Bindung am *KIICL1*- und *KIMLS1*-Promotor einen deutlichen Unterschied zum *KIAdr1*-Wildtyp (Abbildung 27).

Dieses Ergebnis könnte zum einen bedeuten, dass die *K/Adr1*-PAR-Mutation nur in *S. cerevisiae*, nicht aber in *K. lactis*, zu einer gestörten Bindung an DNA führt. Diese Erklärung ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da die Bindedomäne von Adr1-Proteinen und damit wohl auch die Mechanismen der Bindung über Zinkfinger und PAR-Region stark konserviert sind. Vorstellbar ist jedoch, dass *K/Adr1* nicht direkt am *K/ICL1*-Promotor bindet, sondern Teil eines Komplexes ist, dessen Bindung an DNA von einem anderen Transkriptionsfaktor (TF-X) vermittelt wird (Abbildung 50). In ChIP-Analysen würde dann der gesamte Komplex co-immunpräzipitiert werden, weshalb man auch eine Anreicherung von *K/Adr1* am *K/ICL1*-Promotor nachweisen könnte, obwohl *K/Adr1* nicht direkt an die DNA gebunden ist. Dies würde zumindest erklären, weshalb weder die PAR-Mutation von *K/Adr1* noch die Deletion der putativen *K/Adr1*-Bindestellen im Promotor einen Einfluss auf die Repression der *K/ICL1*-Expression haben. Die Unterdrückung des *K/Sip4*-Aktivierungspotentials am *K/ICL1*-Promotor könnte dabei direkt durch *K/Adr1* vermittelt werden, indem *K/Adr1* aufgrund seiner Größe die TAD von *K/Sip4* verdeckt und die Rekrutierung von Co-Aktivatoren durch *K/Sip4* an den Promotor verhindert. Möglicherweise ist auch noch ein weiteres Protein an dieser Repression beteiligt, das mit *K/Adr1* interagiert und eine Art Repressor-Komplex bildet, der die *K/Sip4*-Aktivierungsdomäne maskiert. Diese beiden Szenarien hätten mit Hilfe des GBD-*Sip4* Fusionsproteins nicht überprüft werden können, da *K/Adr1* erst durch TF-X in die räumliche Nähe von *K/Sip4* gebracht wird. Ob es tatsächlich so einen Faktor X gibt, der *K/Adr1* an der *K/ICL1*-Promotor rekrutiert, bleibt offen. Zumindest ist die am *K/ICL1*-Promotor vorherrschende Struktur (z.B. TF-Bindestellen) Voraussetzung dafür ist, dass *K/Adr1* negativ auf die Aktivierung durch *K/Sip4* wirkt.



**Abbildung 50: Mögliche Mechanismen der *K/Adr1*-vermittelten Repression an *K/ICL1*.**

Schematische Darstellung möglicher Mechanismen, die die *K/Sip4*-vermittelte Induktion von *K/ICL1* durch *K/Adr1* reprimieren könnten. **A.** *K/Adr1* bindet an einen unbekanntem TF (TF-X) oder **B.** direkt am *K/ICL1*-Promotor, wodurch *K/Adr1* in räumliche Nähe von *K/Sip4* kommt und direkt oder durch ein weiteres Protein in einer Art Repressor-Komplex reprimierend auf die Genexpression von *K/ICL1* wirken könnte. Möglicherweise unterstützt TF-X in B. zusätzlich die Bindung von *K/Adr1*.



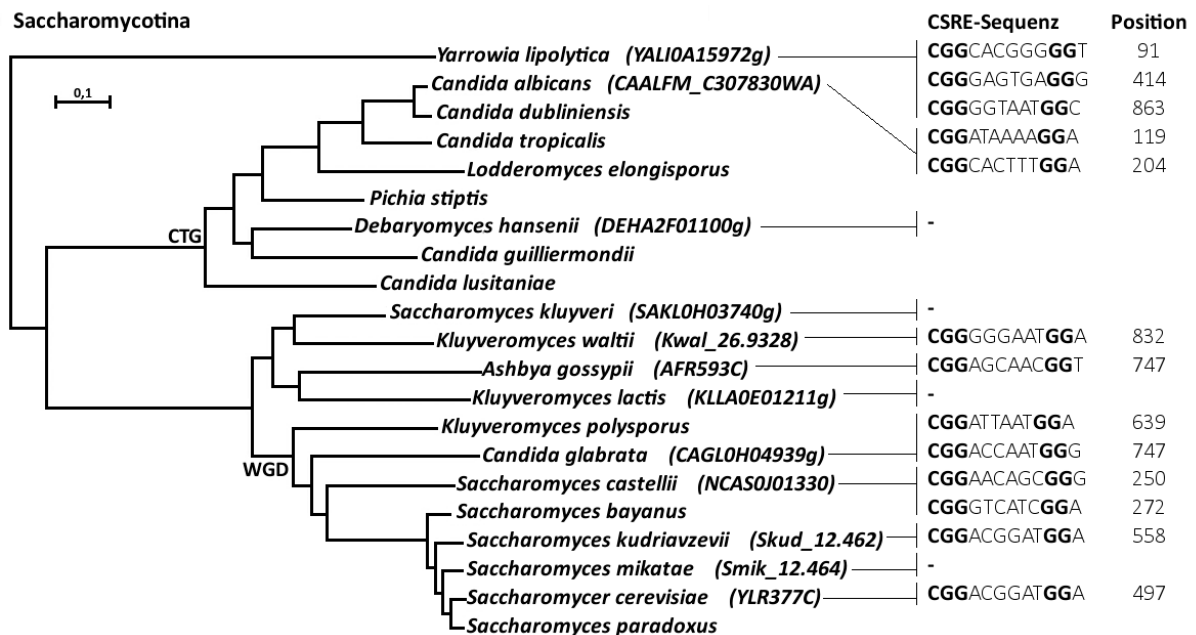
Ob *KIAdr1* nun direkt am *KIICL1*-Promotor bindet oder nicht, kann weder zu 100% bestätigt noch gänzlich ausgeschlossen werden. Da die Überexpression der DNA-Bindedomäne zum Verlust der *KIAdr1*-vermittelten Repression von *KISip4* führt, ist die Bindung von *KIAdr1* am *KIICL1*-Promotor vermutlich schon wichtig. Befindet sich *KIAdr1* in einem Komplex, ist der Effekt einer Punktmutation der DNA-Bindedomäne *in vivo* möglicherweise zu gering sein, um am *KIICL1*-Promotor einen Unterschied zum Wildtyp erfassen zu können. In einem zukünftigen Experiment sollten daher die PAR-mutierten Bindedomänen überexprimiert werden, um einen möglichen Effekt der PAR-Mutation zu verstärken. Sollte die Wirkung von *KIAdr1* an DNA-Bindung gekoppelt sein, würde man durch die überexprimierte mutierte Bindedomäne keinen Unterschied zum Wildtyp erwarten.

Die hier erhobenen Daten verdeutlichen, dass *KIAdr1* im Snf1-regulierten Netzwerk auch in *K. lactis* eine Rolle spielt, auch wenn *KIAdr1* weniger Zielgene hat als *ScAdr1* in *S. cerevisiae*. *KIAdr1* aktiviert Gene der Ethanolverwertung und des Fettsäure-Abbaus und reprimiert gleichzeitig Gene der energieverbrauchenden Ribosomenbiogenese. Daher ist *KIAdr1* bedeutend für den anabolen Stoffwechsel in glukoselimitierenden Bedingungen und trägt in gewisser Weise zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase bei. *KIAdr1* wirkt dabei aber nicht nur als transkriptioneller Regulator von Genexpression. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *KIAdr1* außerdem einen direkten negativen Effekt auf die Aktivierungsfunktion von *KISip4* hat. Ob *ScAdr1* in *S. cerevisiae* eine vergleichbare Wirkung auf *ScCtat8* oder andere TFs hat, wurde bisher nicht untersucht. Doch offensichtlich sind die Transkriptionsfaktoren im *Cat8-Sip4-Adr1*-Netzwerk in *K. lactis* anders miteinander verknüpft als in *S. cerevisiae*. Nicht nur die Induktion von *KISIP4* erfolgt in Abhängigkeit von *KICat8* (Mehlgarten *et al.*, 2015), sondern auch die Aktivierungsfunktion von *KISip4* kann *KIAdr1*-abhängig reguliert werden. Diese Verknüpfung mit *Adr1* könnte in *S. cerevisiae* verloren gegangen sein.

#### 4.5. Transkriptionelle Regulation von *KIFBP1*

Die Fructose-1,6-Bisphosphatase ist ein essentielles Schlüsselenzym der Gluconeogenese, das an der Synthese von C6-Körpern aus niedermolekularen C-Körpern beteiligt ist. In *S. cerevisiae* erfolgt die Regulation von ScFbp1 durch Beeinflussung der Genexpression, der mRNA- und Proteinstabilität sowie durch allosterische Regulation. Die transkriptionelle Regulation der *ScFBP1*-Expression erfolgt u.a. durch die *ScSnf1*-Proteinkinase und den TF *ScCat8*. In *K. lactis* hingegen ist die *KIFBP1*-Expression zwar von *KISnf1*, nicht aber von *KICat8* oder *KISip4* abhängig. Die Regulation der *KIFBP1*-Expression hat sich anscheinend in *K. lactis* divergent von der in *S. cerevisiae* entwickelt.

Die *ScCat8*-abhängige Regulation von *ScFBP1* in *S. cerevisiae* wird durch die Bindung des TFs an ein CSRE-Element vermittelt (Schuller, 2003). Eine Analyse der *FBP1*-Promotorsequenzen von *K. lactis*, *S. cerevisiae* und anderen nah verwandten Hefen der Saccharomycotina-Klade zeigt, dass putative *cis*-regulatorische CSRE-Sequenzen auch in *Yarrowia lipolytica* und *Candida albicans* vorhanden sind, die sich schon sehr früh bei der Entwicklung der Saccharomycotina abgespalten haben (Abbildung 51). Putative Cat8-Orthologe sind auch in weiter entfernt verwandten Hefen wie *Aspergillus nidulans* (FacB) vorhanden und die Bindestelle von FacB ist außerdem homolog zur Cat8-Bindestelle (Todd *et al.*, 1998).



**Abbildung 51: CSREs in *FBP1*-Promotoren verschiedener Saccharomycotina-Spezies.**

Vergleich von *FBP1*-Promotoren verschiedener Saccharomycotina-Spezies hinsichtlich enthaltener CSRE-Sequenzen (Konsensus-Sequenz: CGG(N)<sub>6</sub>GGN, fett gedruckt). Phylogenetischer Stammbaum aus Roetzer *et al.*, 2011. Position der CSREs *upstream* vom Translationsstart.

Zudem führt die Mutation von *FacB* zu einer starken Reduzierung der Fructose-1,6-Bisphosphatase-Aktivität (Armitt *et al.*, 1976). Daher könnte man vermuten, dass sich die Regulation vom *FBP1*-Gen durch *Cat8* über CSRE-Elemente bereits bei einem gemeinsamen Vorfahren vor der Abspaltung der Saccharomycotina entwickelt hat und später in einzelnen Hefen, z.B. *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces mikatae* und eben auch *Kluyveromyces lactis*, verloren gegangen ist (Abbildung 51). Ziel dieser Arbeit war es daher, in *K. lactis* cis-regulatorischen Promotorelemente und *in trans* wirkende Faktoren zu identifizieren, die an der Vermittlung der *KISnf1*-abhängigen Induktion der *KIFBP1*-Expression beteiligt sind.

#### 4.5.1. Induktion der *KIFBP1*-Expression durch $UAS_{KIFBP1}$

In *S. cerevisiae* ist die Expression von *ScFBP1* stark durch Glukose reprimiert, wohingegen nicht-fermentierbare Kohlenstoffe eine starke Induktion der *ScFBP1*-Expression durch den *ScSnf1*-Signalweg hervorrufen. Da in *K. lactis* die Glukose-Repression deutlich schwächer ausgeprägt ist, wurde zunächst überprüft, ob *KIFBP1* überhaupt auf Transkriptionsebene reguliert wird. Northern Blot-Analysen zeigten im Vergleich zu Glukose einen Anstieg der *KIFBP1*-mRNA um das 2,6-fache in Glycerol und um das 1,8-fache in Ethanol (Abbildung 36). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass *KIFBP1* auch in *K. lactis* einer transkriptionellen Regulation unterliegt. Die Analyse der *KIFBP1*-Expression verdeutlicht aber ebenso, dass bereits in Glukose eine detektierbare Menge des Transkripts vorhanden ist. Es könnten demnach weitere Regulationsmechanismen in Anwesenheit von Glukose bedeutend dafür sein, dass Glykolyse und Gluconeogenese nicht gleichzeitig ablaufen. Dabei könnte es sich z.B. um Protein-Degradation handeln, wie es in *S. cerevisiae* der Fall ist, wenn glukose-limitierten Zellen frische Glukose zugeführt wird (Chiang und Shekman, 1991; Schork *et al.*, 1994). Möglicherweise könnte ebenso ein allosterischer Inhibitor die Aktivität von *KIFbp1* in Glukose vermindern. In *S. cerevisiae* wird die *ScFBP1*-mRNA außerdem in Anwesenheit von Glukose abgebaut und bei Glukosemangel *ScSnf1*-abhängig stabilisiert (Mercado *et al.*, 1994; Young *et al.*, 2012). Einer oder die Kombination dieser Mechanismen könnte dazu führen, dass *KIFbp1* in *K. lactis* in Glukose nicht vorhanden oder zumindest nicht aktiv ist.

Mit Hilfe von Deletionsanalysen am *KIFBP1*-Promotor konnte ein 200 bp großes Element lokalisiert werden,  $UAS_{KIFBP1}$ , das die Induktion der Expression in Ethanol vermittelt. Die  $UAS_{KIFBP1}$ -Promotoraktivität vermittelt etwa 75% der Aktivität des Vollängenpromotors (Abbildung 38). Zudem ist die Induktion von  $UAS_{KIFBP1}$  weiterhin abhängig von *KISnf1*

(Abbildung 39), weshalb unspezifische Induktionseffekte des artifiziellen Promotorkonstrukts auf die Genexpression ausgeschlossen werden können. *In silico*-Analysen dieses 200 bp großen Promotorelements zeigen putative Bindestellen für zehn verschiedene TFs (Tabelle 14) und könnten einen Hinweis darauf geben, welcher Faktor möglicherweise einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von *KIFBP1* hat. *KIAdr1* kann jedoch ausgeschlossen werden, da in *Kladr1Δ* weder einen Einfluss auf die *KIFBP1*-Transkriptmenge (Tabelle 7) noch auf die -Promotoraktivität gezeigt werden konnte (Abbildung 37). Auch die Deletion von *KIASH1* (*KLLA0B02651g*), einem TF, der in *S. cerevisiae* am *Mating Type Switch* beteiligt (Sil und Herskowitz, 1996) und dessen Funktion in *K. lactis* nicht bekannt ist, hat keinen Einfluss auf die *KIFBP1*-Expression (Daten nicht gezeigt). *KIReb1* hingegen konnte in dieser Arbeit als  $UAS_{KIFBP1}$ -bindendes Protein identifiziert werden (Abbildung 45). Ob und inwiefern *KIReb1* zur Regulation der *KIFBP1*-Expression beiträgt, wird an anderer Stelle diskutiert (Kapitel 4.5.2).

*KIGis1*, *KINrg1* und *KIGsm1* könnten vielversprechende Kandidaten sein, da diese TFs in *S. cerevisiae* im Zusammenhang mit Kohlenstoffverwertung gebracht werden. Zumindest konnte für *ScGsm1* ein Einfluss auf die Expression von *ScFBP1* und *ScPCK1* (Turcotte *et al.*, 2010) und für *ScGis1* ein Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2009). Die Deletion der einzelnen Faktoren war für diese Arbeit allerdings nicht vorgesehen. Zum einen ist die Konstruktion von Stämmen in *K. lactis* wesentlich zeitaufwendiger als in *S. cerevisiae*, da in *K. lactis* die homologe Rekombination sehr ineffektiv ist (teilweise weniger als 1%; Zeeman und Steensma, 2003) und der Einbau

**Tabelle 14: Putative Bindestellen im  $UAS_{KIFBP1}$**

Transkriptionsfaktor	Konsensus-Sequenz	Position
Adr1	TGGRG	-620, -683
Ash1	YTGAT	-729
Gis1, YER130C	AGGGG	-697
Msn2, Msn4	CCCCT	-702
Nrg1	CCCTC	-701
Reb1	CCGGGTAA	-776
Stb5	CGGNS	-630, -708
Tec1	RMATTCYY	-717
Gsm1	CGG(N) <sub>9</sub> CGG	-775
Haa1	SMGGSG	-696

Auflistung aller *in silico* vorhergesagten TF-Bindestellen im  $UAS_{KIFBP1}$  (Yeasttract.org). M = A/C, N = A/G/C/T, S = C/G, R = A/G, Y = C/T. Die Position bezieht sich auf den Translationsstart.

von Deletionskassetten ins Genom daher überwiegend ortunspezifisch durch *non-homologous end joining* geschieht. Zum anderen können durch die Deletion eines TFs, der an der Regulierung verschiedener Prozesse beteiligt sein könnte, pleiotrope Effekte auf die *KIFBP1*-Expression nicht ausgeschlossen werden. Inzwischen konnte jedoch ein *KInrg1* $\Delta$ -Stamm konstruiert werden (persönliche Mitteilung C. Kleindienst) und Analysen der *KIFBP1*-Expression in diesem Stamm könnten Aufschluss darüber geben, ob *K/Nrg1* an der Regulation von *KIFBP1* beteiligt ist.

#### 4.5.2. Einfluss von *K/Reb1* am *KIFBP1*-Promotor

Zu Beginn der Untersuchungen am *KIFBP1*-Promotor wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren, deren Homologe in *S. cerevisiae* bekanntermaßen einen Einfluss auf die *ScFBP1*-Expression haben, hinsichtlich ihres Effekts auf die *KIFBP1*-Expression in *K. lactis* überprüft. Aus vorherigen Analysen war bereits bekannt, dass *K/Cat8* und *K/Sip4* bei Glukosemangel keinen Einfluss auf die Induktion der *KIFBP1*-Expression haben (Mehlgarten *et al.*, 2015), was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Und auch die Deletion von *KIADR1* oder *KIHAP4* zeigte keine Auswirkung auf die Promotoraktivität von *KIFBP1* (Abbildung 37). Zudem konnte gezeigt werden, dass der *KIFBP1*-Promotor in *S. cerevisiae* transkriptionell inaktiv und nicht durch Ethanol induzierbar ist (Tabelle 9). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der die *KIFBP1*-Expression induzierende Aktivator nur in *K. lactis*, aber nicht in *S. cerevisiae*, vorhanden ist. Dieser Aktivator könnte sich spezifisch in *K. lactis* für die Regulation des gluconeogenischen Gens entwickelt haben oder in *S. cerevisiae* verloren gegangen sein. Möglicherweise könnte der unbekannte Aktivator auch in beiden Hefen vorhanden sein, wobei eine divergente Entwicklung von dessen Funktion in *K. lactis* dazu geführt haben könnte, dass die *KIFBP1*-Induktion in *S. cerevisiae* nicht mehr erfolgen kann.

Mittels *Pulldown*-Assay und massenspektrometrischer Analyse konnte schließlich *K/Reb1* als UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-bindendes Protein aus Rohextrakt von auf Ethanol gewachsenen Zellen identifiziert werden. Durch die Aufreinigung eines rekombinant exprimierten GST-*K/Reb1* konnte die Spezifität der Bindung an eine Reb1-Bindestelle im UAS<sub>*KIFBP1*</sub> über EMSA-Analysen bestätigt werden (Abbildung 45). Zudem führt die Mutation dieser Reb1-Bindestelle zum Verlust einer detektierbaren GST-*K/Reb1*-Bindung am UAS<sub>*KIFBP1*</sub> (Abbildung 46). Das verdeutlicht, dass GST-*K/Reb1* zumindest *in vitro* an UAS<sub>*KIFBP1*</sub> binden kann. Um zu überprüfen, ob die *K/Reb1*-Bindung am *KIFBP1*-Promotor *in vivo* überhaupt von Bedeutung ist, wurde die Reb1-

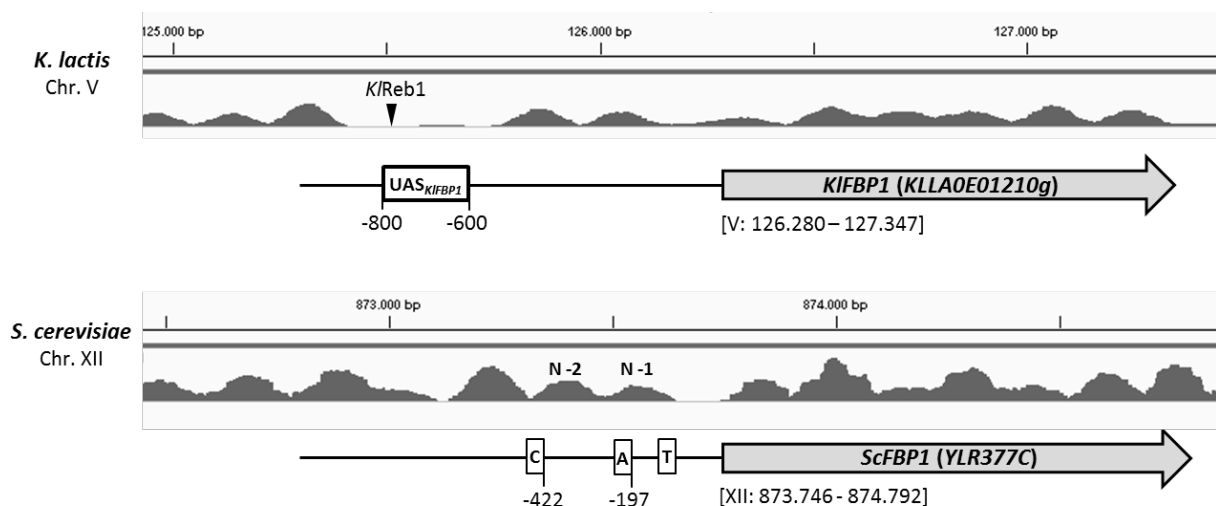
Bindestelle im *KIFBP1*-Vollängenpromotor deletiert, wodurch jedoch keine veränderte *KIFBP1*-Promotoraktivität detektiert werden konnte (Abbildung 47). Dass die Deletion der Reb1-Bindestelle keinen Effekt hat, könnte zum einen bedeuten, dass *K/Reb1 in vivo* nicht am *KIFBP1*-Promotor bindet oder die Bindung zumindest nicht relevant für die Aktivität des Promotors ist. Ob *K/Reb1* überhaupt *in vivo* am  $UAS_{KIFBP1}$  bindet, sollte daher unbedingt durch ChIP-Analysen geklärt werden. Dadurch könnte auch geklärt werden, ob *K/Reb1* permanent oder nur bei bestimmten Bedingungen am *KIFBP1*-Promotor bindet. Zum anderen wäre es auch möglich, dass die Deletion der Reb1-Bindestelle allein keinen Effekt hat, weil mehrere Faktoren gemeinsam die *KIFBP1*-Expression regulieren.

*K/Reb1* wurde in *K. lactis* als *Silencer* am *Mating Type*-Lokus *KIHML $\alpha$*  identifiziert (Sjöstrand *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* binden ScRap1, ScAbf1 und ScORC (*Origin Recognition Complex*) in den Promotoren der *Mating Type*-Loci und rekrutieren Sir-Proteine, die Histonschwänze deacetylieren und damit zur Stilllegung der Loci führen (Brand *et al.*, 1987; Shore und Nasmyth, 1987; Rine und Herskowitz, 1987; Smith *et al.*, 2000). Auch in *K. lactis* werden Sir-Proteine für das *Silencing* am *Mating Type*-Lokus benötigt (Åström und Rine, 1998). Daher wäre es möglich, dass *K/Reb1* an der Rekrutierung der Sir-Proteine beteiligt ist. Doch *Silencing* in dieser Form spielt in *K. lactis* hauptsächlich am *Mating Type*-Lokus sowie an Telomerregionen eine Rolle (Gurevich *et al.*, 2003). Zudem führt die Deletion der *K/Reb1*-Bindestelle im *KIFBP1*-Promotor nicht zu einer Erhöhung der Promotoraktivität (Abbildung 47). Daher kann ausgeschlossen werden, dass *K/Reb1* am *KIFBP1*-Promotor zur Stilllegung der Genexpression führt.

In der Bäckerhefe spielt ScReb1 eine wichtige Rolle für die Nukleosomenstruktur am *Housekeeping*-Gen Profilin (*ScPFY1*). Die Bindung am *ScPFY1*-Promotor führt zu einer DNA-Konformation, die nicht durch Nukleosomen verpackt werden kann und damit zur Ausbildung einer NFR (Angermayr *et al.*, 2003). ScReb1 hat allerdings nur ein niedriges Transkriptionsaktivierungspotential, doch synergistische Effekte zwischen ScReb1 und AT-reichen Sequenzen oder anderen schwachen Aktivatoren können zur Steigerung der Genexpression führen (Struhl, 1987; Chasman *et al.*, 1990). An regulierten Promotoren wie *ScGCY1* oder *ScHSC82* ist ScReb1 hauptsächlich für basale Expression bedeutend (Erkine *et al.*, 1996; Angermayr und Bandlow, 2003). Untersuchungen von Bai *et al.* (2011) am *ScCLN2*-Promotor verdeutlichten, dass für die Ausbildung einer überdurchschnittlich langen NFR ScReb1 gemeinsam mit ScRap1, ScRsc3 und ScMcm1 benötigt wird. Die Deletion einer

einzelnen Bindestelle zeigte keinerlei Effekt auf die Ausbildung der NFR, da die anderen Faktoren den Verlust wahrscheinlich kompensieren können. Erst die Mutation aller vorhandenen Bindestellen führte zur Auslöschung der NFR. Zudem wurde in verschiedenen Untersuchungen deutlich, dass ScReb1 häufig an der proximalen Grenze von NFRs gebunden ist und eine Barriere bildet (Koerber *et al.*, 2009; Rhee und Phug, 2011; Zhang *et al.*, 2016). Damit verhindert ScReb1 das Eindringen von Nukleosomen in die NFR.

Betrachtet man die Nukleosomenpositionierung am *KIFBP1*-Promotor in *K. lactis*, ist deutlich zu erkennen, dass auch hier ein relativ langer nukleosomenfreier Bereich vorhanden ist, in dem  $UAS_{KIFBP1}$  und die Reb1-Bindestelle liegen (Abbildung 52 oben). Daher liegt die Vermutung nahe, dass *K/Reb1* am *KIFBP1*-Promotor für die Ausbildung einer NFR bedeutend sein könnte. Da es sich hierbei, ähnlich wie im *ScCLN2*-Promotor, um einen relativ langen Bereich handelt (ca. 320 bp), könnten durchaus mehrere Faktoren an der Ausbildung der NFR beteiligt sein. Diese Hypothese könnte zumindest erklären, weshalb die Deletion der *K/Reb1*-Bindestelle im *KIFBP1*-Promotor keinen Effekt auf die Promotoraktivität hat. Auch hier könnte der Verlust der Bindung von *K/Reb1* durch andere Faktoren kompensiert werden. *In silico*-Analysen der NFR-umspannenden Sequenz im *KIFBP1*-Promotor ergaben zwar keine Treffer für andere DNA-bindenden Faktoren wie Rap1 oder Rsc3. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es einen weiteren Faktor gibt, der an eine bisher unbekannte Sequenz bindet.



**Abbildung 52: Chromatinstruktur am *FBP1*-Promotor in *K. lactis* und *S. cerevisiae*.**

Darstellung der Nukleosomenstruktur am *FBP1*-Promotor in *K. lactis* und *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Glukose. Daten aus Tsankov *et al.*, 2010). Angegeben sind die Positionen auf dem Chromosom. Ein Peak entspricht einem Nukleosom. N-2 und N-1 sind bekannte positionierte Nukleosomen (siehe Abbildung 7). C - CSRE, A - Adr1-Bindestelle, T - TATA-Box. Visualisierung mit IGV (*Integrative Genomics Viewer*; Robinson *et al.*, 2011).

Für die Analyse der Nukleosomenpositionierung in *K. lactis* wurden die Zellen in 2% Glukose angezogen (Tsankov *et al.*, 2010). Daraus wird ersichtlich, dass die Ausbildung der NFR bereits in Glukose erfolgt und nicht erst durch Glukosemangel induziert wird. *KIReb1* hat daher möglicherweise keine Bedeutung für die *KISnf1*-abhängige Induktion der *KIFBP1*-Expression. Die NFR könnte jedoch zur Basalexpression von *KIFBP1* in Glukose beitragen.

Vergleicht man die Nukleosomenpositionierung am *FBP1*-Promotor in *K. lactis* mit der in *S. cerevisiae* (Abbildung 52 unten), werden deutliche Unterschiede in der prinzipiellen Chromatinstruktur am Promotor deutlich. Im Gegensatz zu *K. lactis* sind in *S. cerevisiae* wichtige *cis*-regulatorische Elemente am *ScFBP1*-Promotor wie TATA-Box und *ScAdr1*-Bindestelle vom positionierten "-1"-Nukleosom verdeckt. Erst die Rekrutierung von Co-Aktivatoren bei Glukosemangel führt zum Verdrängen der Nukleosomen, wodurch die Bindung genereller Faktoren der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht wird (siehe Kapitel 1.6). Diese Daten bestätigen, dass sich die Regulation von *FBP1* in *K. lactis* und *S. cerevisiae* divergent entwickelt hat und legen nahe, dass die Etablierung einer NFR im *KIFBP1*-Promotor damit zusammen hängen könnte.

#### 4.5.3. Einfluss isolierter Suppressoren auf UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-Aktivität

Mit Hilfe eines genetischen Ansatzes sollten in dieser Arbeit Faktoren identifiziert werden, die *in trans* am UAS<sub>*KIFBP1*</sub> wirken. Als Reporter diente hier ein von UAS<sub>*KIFBP1*</sub> angetriebenes *KIHis3*. Basal exprimiertes *KIHis3* konnte durch 3-AT inhibiert werden, was in einen Wachstumsdefekt des Reporterstammes resultiert. Dies erlaubte ein *Screening* nach Faktoren, deren Überexpression zu einer gesteigerten UAS<sub>*KIFBP1*</sub>-Promotoraktivität führt und den Wachstumsdefekt supprimieren kann.

In diesen Untersuchungen konnten *KIGAC1*, *KICDC25*, *KIMPA43* und *KIRAD50* als Suppressor-Gene isoliert werden, die ein verbessertes Wachstum des Reporterstammes auf Medium mit 3-AT zeigen (Abbildung 41 und Tabelle 10). Eine Analyse der *KIFBP1*-Expression ergab jedoch, dass die Überexpression dieser Gene nicht zu einer Steigerung des *KIFBP1*-Transkripts führt (Abbildung 42). Für diese Untersuchungen wurden die Zellen für vier Stunden in Ethanol inkubiert. Möglicherweise ist der Effekt durch die überexprimierten Suppressoren zu gering, um eine erhöhte *KIFBP1*-Expression nachweisen zu können. Im *Screen* erfolgte das Wachstum des Reporterstammes über mehrere Tage, weshalb es zu einer „Anreicherung“



des Effekts und möglicherweise erst dadurch zu verbessertem Wachstum gekommen sein kann.

Interessanterweise kann für drei der vier Suppressoren ein Zusammenhang mit *K/Snf1* hergestellt werden. *KIGAC1* kodiert für eine regulatorische Untereinheit der Typ 1-Proteinphosphatase (PP1). Die katalytische Untereinheit dieses Komplexes ist *K/Glc7*. Die regulatorische Untereinheit der PP1 bestimmt die Substratspezifität. In *S. cerevisiae* wird der Komplex u.a. durch *ScBin4* zur Knospe (Kozubowski *et al.*, 2003), durch *ScReg1* zur *ScSnf1*-Kinase (Ludin *et al.*, 1998) und durch *ScGac1* zur Glycogensynthase *ScGy2* dirigiert (François *et al.*, 1992), wobei zwischen den regulatorischen Untereinheiten Konkurrenz um die Bindung an *ScGlc7* herrscht. Die konkurrierende Bindung konnte durch *in vitro*- und *in vivo*-Daten belegt werden (Egloff *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001). Die Überexpression von *ScGAC1* führt zur Verschiebung des Gleichgewichts, weshalb weniger *ScReg1* an *ScGlc7* gebunden ist. Da *ScReg1/ScGlc7* für die Dephosphorylierung von *ScSnf1* in Glukose verantwortlich ist, resultiert das verschobene Gleichgewicht in einer partiellen Aufhebung der Glukose-Repression (Wu *et al.*, 2001). Durch diesen oder einen ähnlichen Mechanismus könnte auch die Überexpression von *KIGAC1* die *K/Snf1*-Aktivität beeinflussen.

Ein weiterer Suppressor, *K/CDC25*, kodiert für einen GDP/GTP-Austauschfaktor. In *S. cerevisiae* aktiviert *ScCdc25* die GTPasen *ScRas1* und *ScRas2*, was wiederum zur Aktivierung der Adenylatcyclase *ScCyr1* und aufgrund eines ansteigenden cAMP-Niveaus zur Aktivierung der Proteinkinase A führt (Review: Tamanoi, 2011). *ScCdc25* hat allerdings eine weitere, noch unbekannt Funktion außerhalb des Ras-Signalwegs. *ScCdc25* ist auch im Zellkern vorhanden und konnte in Komplexen mit verschiedenen nukleären Proteinen (z.B. *ScFpr3* und *ScGlc7*) detektiert werden (Ho *et al.*, 2002; Tisi *et al.*, 2008). *ScCDC25* ist zudem essentiell für das Wachstum auf Galaktose und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen und die Überexpression von *ScCDC25* führt zur Derepression Glukose-reprimierter Gene (*ScGAL10*, *ScSUC2*) (Rudoni *et al.*, 2000; Folch-Mallol *et al.*, 2004). Wie genau *ScCdc25* auf den Kohlenstoffmetabolismus wirkt, ist bis heute unbekannt. Da *ScSnf1* ein zentraler Regulator der Glukose-Repression ist, wäre es durchaus möglich, dass die Überexpression von *ScCDC25* Einfluss auf die Aktivität der *ScSnf1*-Kinase hat und auch in Anwesenheit von Glukose die Derepression glukose-reprimierter Gene vermittelt. Die Überexpression von *K/CDC25* könnte daher auch in *K. lactis* einen Effekt auf *K/Snf1* haben.

Ob die Überexpression von *KIMPA43* mit *KISnf1* im Zusammenhang steht, ist rein spekulativ, da auch in *S. cerevisiae* die Funktion des Gens sowie die Substratspezifität des Proteins unbekannt ist. *ScMpa43* besitzt eine FGGY-Kohlenhydrat-Kinasedomäne und ist auch in anderen Hefen stark konserviert (Abbildung A4). Zur Familie der FGGY-Kohlenhydrat-Kinasen gehören u.a. Glucono- und Glycerolkinasen ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk); Pfam PF02782 und PF00370). Möglicherweise katalysiert *KIMpa43* die Phosphorylierung von Glycerol, wodurch die Überexpression von *KIMPA43* die Konzentration von Metaboliten des Kohlenhydrat-Stoffwechsels beeinflussen könnte. Allosterische Regulation durch Metabolite spielt bei vielen Enzymen eine wichtige Rolle und könnte auch einen Einfluss auf die *KISnf1*-Aktivität haben.

Die hier dargestellten Zusammenhänge legen nahe, dass die Expression von *KIHIS3* im Reporterstamm durch *KISnf1* beeinflusst wird. In *K. lactis* ist jedoch nichts über eine *KISnf1*-Abhängigkeit von *KIHIS3* bekannt. Diese Abhängigkeit wurde anscheinend durch das Einbringen der  $UAS_{KIFBP1}$ , die *KISnf1*-abhängig reguliert wird, erreicht. In dieser 200 bp langen Sequenz liegt demnach der Schlüssel der *KISnf1*-abhängigen Regulation des *KIFBP1*-Promotors. Obwohl in den hier durchgeführten Analysen kein „klassischer“ Transkriptionsaktivator identifiziert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es einen TF gibt, der am  $UAS_{KIFBP1}$  bindet und *KISnf1*-abhängig positiv die *KIFBP1*-Expression beeinflusst. Dieser Effekt könnte jedoch so gering sein, dass auch die Überexpression des TFs keine Erhöhung der Promotoraktivität bewirkt. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass *KISnf1* nicht über einen TF, sondern über einen ganz anderen Mechanismus direkt am *KIFBP1*-Promotor wirkt. Wie bereits erwähnt ist *ScSnf1* in *S. cerevisiae* an der Stabilisierung von mRNA glukose-reprimierter Gene beteiligt (Young *et al.*, 2012) und ein solcher Mechanismus wäre auch für *KIFBP1* denkbar. An  $UAS_{KIFBP1}$  könnte ein Faktor binden, der *KISnf1*-abhängig einen Komplex rekrutiert, der co-transkriptionell die *KIFBP1*-mRNA modifiziert und vor Abbau schützt. Durch co-transkriptionelle Modifizierung könnte  $UAS_{KIFBP1}$  auch die Stabilität von Reporter-gen-mRNAs (wie *GUS* oder *KIHIS3*) beeinflussen, doch ob diese mRNAs über Stabilität reguliert werden, ist fraglich.

## 5. Zusammenfassung

Kohlenstoffe sind die Grundlage allen Lebens und dienen Organismen als Energiequelle und zur Biomasseproduktion. Gewonnene Erkenntnisse zur Regulation des Kohlenstoffmetabolismus aus dem Hefe-Modellsystem *S. cerevisiae* lassen sich jedoch nur bedingt auf höhere Eukaryoten übertragen, da sie grundlegende physiologische Unterschiede aufweisen. Während in der Crabtree-positiven Hefe *S. cerevisiae* Glukose durch Fermentation verstoffwechselt wird, überwiegen in höheren Eukaryoten, genauso wie in Crabtree-negativen Hefen, respiratorische Prozesse. Untersuchungen zur Kohlenstoffverwertung in der Crabtree-negativen Hefe *K. lactis* sind daher von großem Interesse. Wird Glukose ein limitierender Faktor, erfolgt eine massive Umprogrammierung des Transkriptoms, um alternative Kohlenstoffquellen verwerten zu können.

Um die primäre Antwort des Glukoseentzugs in *K. lactis* zu untersuchen, wurden Zellen in ethanol- bzw. glycerolhaltiges Medium überführt und Transkriptomanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich zum einen eine generelle Antwort auf Glukosemangel, z.B. Induktion von Genen des Glyoxylat-Zyklus und der Fettsäure-Oxidation. Zum andern wurden kohlenstoffspezifische Unterschiede deutlich. Während in Ethanol eine Vielzahl energieverbrauchender Prozesse reduziert werden, erfolgt in Glycerol eine starke Induktion von Genes des Threonin-Abbaus und Methylcitrat-Zyklus. Der Vergleich zu *S. cerevisiae* und anderen *Saccharomyces*-Spezies legt nahe, dass Hefen über ein gemeinsames Repertoire an metabolischen Prozessen verfügen, um auf Veränderungen von Nährstoffverfügbarkeit reagieren zu können. Jedoch hat die Anpassung an verschiedene Lebensräume zur Entwicklung spezies-spezifischer Unterschiede geführt.

Der Snf1-Signalweg ist von enormer Bedeutung unter glukose-limitierenden Bedingungen. Der Snf1-Kinasekomplex ist hoch konserviert zum AMPK-Komplex aus Säugern und ein zentraler Regulator, um die Energiehomöostase aufrecht zu halten. Die Komponenten dieses Signalwegs sind auch in *S. cerevisiae* und *K. lactis* vorhanden, doch die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren (TF) Cat8 und Sip4 hat sich in den beiden Hefen divergent entwickelt. Daher wurde in dieser Arbeit die Bedeutung eines weiteren Snf1-abhängigen Transkriptionsaktivators, *Adr1*, in *K. lactis* untersucht. Dabei könnte *KLLA0F13046g (KIADR1)* als homologes Gen zu *ScADR1* identifiziert werden. *KIAdr1* hat in *K. lactis* nur einen sehr geringen Einfluss auf die transkriptomweite Genexpression. Einige Gene des Kohlenstoffmetabolismus werden

in Glycerol und Ethanol *K/Adr1*-abhängig induziert, wohingegen *K/Adr1* ausschließlich in Glycerol reprimierend auf die Expression von Genen des Glyoxylat-Zyklus wirkt. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* gibt es nur einen kleinen Überlapp *Adr1*-abhängig regulierter Gene, was auf eine divergente Entwicklung der Bedeutung von *Adr1* hindeutet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige Gene von *K/Adr1* und *K/Sip4* co-reguliert werden. Gene des Glyoxylat-Zyklus werden durch *K/Sip4* induziert, doch dem wirkt *K/Adr1* in Anwesenheit von Glycerol entgegen. Exemplarische Analysen am Promotor der Isocitratlyase (*K/ICL1*) verdeutlichten die Bedeutung von *K/Adr1* für die Glycerol-Repression von *K/ICL1*. *K/Adr1* ist zwar am *K/ICL1*-Promotor detektierbar, doch weder die Deletion der *K/Adr1*-Bindestelle noch die Mutation der DNA-Bindedomäne von *K/Adr1* beeinflussen die Glycerol-Repression. *K/Adr1* wirkt vermutlich direkt negativ auf die *K/Sip4*-Aktivierungsfunktion am *K/ICL1*-Promotor und befindet sich möglicherweise in einem Komplex mit einem anderen TF, der die Bindung von *K/Adr1* am Promotor unterstützen könnte.

Bei Glukosemangel ist die Induktion von Genen der Gluconeogenese essentiell, um aus niedermolekularen C-Körpern Zuckerphosphate für die Biomasseproduktion zu gewinnen. Die Regulation des gluconeogenischen Schlüsselenzyms Fructose-1,6-bisphosphatase (*ScFBP1*) erfolgt in *S. cerevisiae* auf transkriptioneller Ebene *ScSnf1*-abhängig u.a. durch die TFs *ScCat8* und *ScSip4*. Auch in *K. lactis* ist die *K/IFBP1*-Expression abhängig von *K/Snf1*, doch keiner der beiden oben genannten TFs bewirkt eine Induktion von *K/IFBP1*. In Analysen zur transkriptionellen Regulation von *K/IFBP1* konnte in dieser Arbeit ein 200 bp großes *cis*-regulatorisches Element identifiziert werden ( $UAS_{K/IFBP1}$ ), das für die Induktion der Promotoraktivität in nicht-fermentierbaren C-Quellen verantwortlich ist. Bestrebungen, einen *in trans* wirkenden Aktivator zu isolieren, waren in dieser Arbeit nicht erfolgreich. Dennoch konnte *K/Reb1* als ein  $UAS_{K/IFBP1}$ -bindendes Protein isoliert werden, das möglicherweise an der Ausbildung einer nukleosomenfreien Region (NFR) am *K/IFBP1*-Promotor beteiligt ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abate, G., Bastonini, E., Braun, K. A., Verdone, L., Young, E. T. und Caserta, M.** (2012): Snf1/AMPK regulates Gcn5 occupancy, H3 acetylation and chromatin remodelling at *S. cerevisiae* ADY2 promoter. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 419-427.
- Agatep, R., Kirkpatrick, R. D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A. und Gietz, R. D.** (1998): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online* **1**: 133-137.
- Aitken, A.** (2006): 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**: 162-172.
- Akada, R., Kawahata, M. und Nishizawa, Y.** (2000): Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast. *BioTechniques* **5**: 854-856.
- Amodeo, G. A., Rudolph, M. J. und Tong, L.** (2007): Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* **449**: 492-495.
- Angermayr, M. und Bandlow, W.** (2003): Permanent nucleosome exclusion from the Gal4p-inducible yeast *GCY1* promoter. *J Biol Chem* **278**: 11026-11031.
- Angermayr, M., Oechsner, U. und Bandlow, W.** (2003): Reb1p-dependent DNA bending effects nucleosome positioning and constitutive transcription at the yeast profilin promoter. *J Biol Chem* **278**: 17918-17926.
- Armitt, S., McCullough, W. und Roberts, C. F.** (1976): Analysis of acetate non-utilizing (acu) mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **92**: 263-282.
- Ashrafi, K., Lin, S. S., Manchester, J. K. und Gordon, J. I.** (2000): Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* **14**: 1872-1885.
- Åström, S. U. und Rine, J.** (1998): Theme and variation among silencing proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **148**: 1021-1029.
- Avigad, G.** (1981): Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **102**: 985-991.
- Badis, G., Chan, E. T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., et al.** (2008): A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell* **32**: 878-887.
- Bai, L., Ondracka, A. und Cross, F. R.** (2011): Multiple sequence-specific factors generate the NDR on *CLN2* promoter. *Mol Cell* **42**: 465-476.
- Bannister, A. J. und Kouzarides, T.** (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**: 381-395.
- Bianchi, M. M., Tizzani, L., Destruelle, M., Frontali L. und Wésolowski-Louvel, M.** (1996): The 'petite-negative' yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Mol Microbiol* **19**: 27-36.
- Bianchi, M. M., Falcone, C., Re, C. X., Wésolowski-Louvel, M., Frontali, L. und Fukuhara, H.** (1987): Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 µm circular plasmid pKD1. *Current genetics* **3**: 185-192.

- Biddick, R. K., Law, G. L. und Young, E. T.** (2008a): Adr1 and Cat8 mediate coactivator recruitment and chromatin remodeling at glucose-regulated genes. *PLoS One* **1**: e1436.
- Biddick, R. K., Law, G. L., Chin, K. K. B. und Young, E. T.** (2008b): The transcriptional coactivators SAGA, SWI/SNF, and Mediator make distinct contributions to activation of glucose-repressed genes. *J Biol Chem* **283**: 33101-33109.
- Billard, P., Ménart, S., Blaisonneau, J., Bolotin-Fukuhara, M., Fukuhara, H. und Wésolowski-Louvel, M.** (1996): Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J Bacteriol* **178**: 5860-5866.
- Blank, L. M., Lehmbeck, F. und Sauer, U.** (2005): Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* **5**: 545-558.
- Blumberg, H., Hartshorne, T. A. und Young, E. T.** (1988): Regulation of expression and activity of the yeast transcription factor ADR1. *Mol Cell Biol* **5**: 1868-1876.
- Blumberg, H.** (1987): Characterization of Adr1, a transcription factor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. University of Washington, Seattle.
- Bornaes, C., Ignjatovic, M. W., Schjerling, P., Kielland-Brandt, M. C. und Holmberg, S.** (1993): A regulatory element in the *CHA1* promoter which confers inducibility by serine and threonine on *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Mol Cell Biol* **13**: 7604-7611.
- Borneman, A. R., Gianoulis, T. A., Zhang, Z. D., Yu, H., Rozowsky, J., Seringhaus, M. R., et al.** (2007): Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**: 815-819.
- Bowers, P. M., Schaufler, L. E. und Klevt, R. E.** (1999): A folding transition and novel zinc finger accessory domain in the transcription factor ADR1. *Nat Struct Biol* **5**: 478-485.
- Brand, A. H., Micklem, G. und Nasmyth, K.** (1987): A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell* **51**: 709-719.
- Brandl, C. J. and Struhl, K.** (1990): A nucleosome-positioning sequence is required for *GCN4* to activate transcription in the absence of TATA element. *Mol Cell Biol* **8**: 4256-4265.
- Braun, K. A., Parua, P. K., Dombek, K.M., Miner, G.E. und Young, E.T.** (2013): 14-3-3 (Bmh) proteins regulate combinatorial transcription following RNA polymerase II recruitment by binding at Adr1-dependent promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **33**: 712-724.
- Breunig, K. D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M. M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., et al.** (2000): Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 771-780.
- Breunig, K. D. und Kuger, P.** (1987): Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: *LAC9*-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site. *Mol Cell Biol* **12**: 4400-4406.
- Brock, M. und Buckel, W.** (2004): On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem* **271**: 3227-3241.

- Brons, J. F., De Jong, M., Valens, M., Grivell, L. A., Bolotin-Fukuhara, M. und Blom, J.** (2002): Dissection of the promoter of the *HAP4* gene in *S. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast* **19**: 923-932.
- Bui, D. M., Kunze, I., Horstmann, Schmidt, T., Breunig, K. D. und Kunze, G.** (1996): Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 102-106.
- Bussereau, F., Casaregola, S., Lafay, J. F. und Bolotin-Fukuhara, M.** (2006): The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators. *FEMS Yeast Res* **6**: 325-335.
- Byrne, K. P. und Wolfe, K. H.** (2005): The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* **15**: 1456-1461.
- Byrnes, J. K., Morris, G. P. und Li, W. H.** (2006): Reorganization of adjacent gene relationships in yeast genomes by whole genome duplication and gene deletion. *Mol Biol Evol* **23**: 1136-1143.
- Carling, D.** (2004): The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* **29**: 18-24.
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C. und Leao, C.** (1999): The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. *J Bacteriol* **181**: 2620-2623.
- Cassart, J.-P., Georis, I., Ostling, J., Ronne, H. und Vandenhoute, J.** (1995): The *MIG1* repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **37**: 191-194.
- Charbon, G., Breunig, K. D., Wattiez, R., Vandenhauten, J. und Noël-Georis, I.** (2004): Key Role of Ser562/661 in Snf1-Dependent Regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol Cell Biol* **24**: 4083-4091.
- Chandrashekarappa, D. G., McCartney, R. R. und Schmidt, M. C.** (2013): Ligand binding to the AMP-activated protein kinase active site mediates protection of the activation loop from dephosphorylation. *J Biol Chem* **288**: 89-98.
- Chandrashekarappa, D. G., McCartney, R. R. und Schmidt, M. C.** (2011): Subunit and domain requirements for adenylate-mediated protection of Snf1 kinase activation loop from dephosphorylation. *J Biol Chem* **286**: 44532-44541.
- Chasman, D. I., Lue, N. F., Buchman, A. R., LaPointe, J. W., Lorch, Y. und Kornberg, R. D.** (1990): A yeast protein that influences the chromatin structure of UASG and functions as a powerful auxiliary gene activator. *Genes Dev* **4**: 503-514.
- Chen, X., Guo, L., Fan, Z. und Jiang, T.** (2008): W-AlignACE: an improved Gibbs sampling algorithm based on more accurate position weight matrices learned from sequence and gene expression/ChIP-chip data. *Bioinformatics* **9**: 1121-1128.
- Cheng, C., Kacherovsky, N., Dombek, K. M., Camier, S., Thukral, S. K., Rhim, E. und Young, E. T.** (1994): Identification of potential target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. *Mol Cell Biol* **14**: 3842-3852.

- Cherry, J. R., Johnson, T. R., Dollard, C., Shuster, J. R. und Denis, C. L.** (1989): Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* **56**: 409-419.
- Chiang, Y.-C., Komarnitsky, P., Chase, D. und Denis, C. L.** (1996): Adr1 activation domains contact the histone acetyltransferase Gcn5 and the core transcriptional factor TFIIIB. *J Biol Chem* **271**: 32359-32365.
- Chiang, H. L. und Schekman, R.** (1991): Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* **350**: 313-318.
- Chu, D. und Barnes, D. J.** (2016): The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Sci Rep* **6**: 25191.
- Ciriacy, M.** (1979): Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **176**: 427-431.
- Ciriacy, M.** (1976): Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **145**: 327-333.
- Ciriacy, M.** (1975): Genetics of Alcohol Dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of glucose-repressible ADHII. *Mol Gen Genet* **138**: 157-164.
- Colin, J., Candelli, T., Porrua, O., Boulay, J. Zhu, C., Lacroute, F., et al.** (2014): Roadblock termination by Reb1p restricts cryptic and readthrough transcription. *Mol Cell* **5**: 667-680.
- Conant, G.C. und Wolfe, K. H.** (2007): Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol* **3**: 129.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M. und Thevelein, J. M.** (2014): Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 254-299.
- Cook, W. J., Chase, D., Audino, D. C. und Denis, C. L.** (1994a): Dissection of the Adr1 protein reveals multiple, functionally redundant activation domains interspersed with inhibitory regions: evidence for a repressor binding to the ADRV region. *Mol Cell Biol* **14**: 629-640.
- Cook, W. J., Mosley, S. P., Audino, D. C., Mullaney, D. L., Rovello, a., Stewart, G. und Denis, C. L.** (1994b): Mutations in the zinc-finger region of the yeast regulatory protein ADR1 affect both DNA binding and transcriptional activation. *J Biol Chem* **12**: 9374-9379.
- Crabtree, H. G.** (1929): Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* **23**: 536-545.
- Dalal, C. K., Zuleta, I. A., Mitchell, K. F., Andes, D. R., El-Samad, H. und Johnson, A. D.** (2016): Transcriptional rewiring over evolutionary timescales changes quantitative and qualitative properties of gene expression. *eLife* **5** (pii): e18981.
- De Deken, R. H.** (1966): The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol* **44**: 149-156.
- Denis, C. L., Fontaine, S. C., Chase, D., Kemp, B. E. und Bemis, L. T.** (1992): ADR1c mutations enhance the ability of ADR1 to activate transcription by a mechanism that is independent of



effects on cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Ser-230. *Mol Cell Biol* **12**: 1507-1514.

**Denis, C. L., Kemp, B. E. und Zoller, M. J.** (1991): Substrate specificities for yeast and mammalian cAMP-dependent protein kinases are similar but not identical. *J Biol Chem* **266**: 17932-17935.

**Denis, C. L. und Gallo, C.** (1986): Constitutive RNA synthesis for the yeast activator ADR1 and identification of the ADR1-5c mutation: implications in posttranslational control of ADR1. *Mol Cell Biol* **6**: 4026-4030.

**DeRisi, J. L., Vishwanath, R. I. and Brown, P. O.** (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on genomic scale. *Science* **278**: 680-686.

Deutscher, J., Francke, C. und Postma, P. W. (2006): How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.

**Diaz-Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., Devin, A. und Rigoulet, M.** (2009): Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 252-265.

**Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B.** (2002): Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**: 847-853.

**Dixon, G. H. und Kornberg, H. L.** (1959): Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J* **72**: 3p.

**Dombek, K. M. und Young, E. T.** (1997): Cyclic AMP-dependent protein Kinase inhibits *ADH2* expression in part by decreasing expression of the transcription factor gene *Adr1*. *Mol Cell Biol* **3**: 1450-1458.

**Domin, N., Wilson, D. und Brock, M.** (2009): Methylcitrate cycle activation during adaptation of *Fusarium solani* and *Fusarium verticillioides* to propionyl-CoA-generating carbon sources. *Microbiology* **155** (Pt 12): 3903-3912.

**Dong, J. und Dickson, R. C.** (1997): Glucose represses the lactose-galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1-dependent pathway that modulates galactokinase (*GAL1*) gene expression. *Nucleic Acid Res* **18**: 3657-3664.

**Dudley, A. M., Rougeulle, C. und Winston, F.** (1999): The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo. *Genes Dev* **13**: 2940-2945.

**Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., et al.** (2004): Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.

**Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P. und Barford, D.** (1997): Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* **16**: 1876-1887.

**Eppler, T., Postma, P., Schütz, A., Völker, U. und Boos, W.** (2002): Glycerol-3-Phosphate-Induced Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 3044-3052.

- Erkine, A. M., Adams, C. C., Diken, T. und Gross, D. S.** (1996): Heat shock factor gains access to the yeast *HSC82* promoter independently of other sequence-specific factors and antagonizes nucleosomal repression of basal and induced transcription. *Mol Cell Biol* **16**: 7004-7017.
- Fedor, M. J., Lue, N. F. und Kornberg, R. D.** (1988): Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream, activating sequence in yeast. *J Mol Biol* **204**: 109-127.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., et al.** (2005): A member of the sugar transporter family, *Stl1p* is the glycerol/H<sub>1</sub>symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.
- Field, Y., Kaplan, N., Fondufe-Mittendorf, Y., Moore, I. K., Sharon, E., Lubling, Y., et al.,** (2008): Distinct modes of regulation by chromatin through nucleosome positing signals. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000216.
- Flikweert, M. T., van der Zanden, K., Janssen, W. M. P. T. M., Steensma, H.Y., van Dijken, J. P. und Pronk, J. T.** (1996): Pyruvate decarboxylase an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* **12**: 247-257.
- Flores, C.-L., Rodríguez, C. Petit, T. und Gancedo, C.** (2000): Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 507-529.
- Folch-Mallol, J. L., Martínez, L. M., Casas, S. J., Yang, R., Martínez-Anaya, C., López L., et al.** (2004): New roles for *CDC25* in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150** (Pt 9): 2865-2879.
- Fowler, P. W., Ball, A. J. S. und Griffiths, D. E.** (1972): The control of alcohol dehydrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J of Biochem* **1**: 35-43.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. und Postlethwait, J.** (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531-1545.
- François, J. M., Thompson-Jaeger, S., Skroch, J., Zellenka, U., Spevak, W. und Tatchell, K.** (1992): *GAC1* may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **11**: 87-96.
- Galazzo, J. L. und Bailey, J. E.** (1990): Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech* **12**: 162-172.
- Gancedo, J. M., Clifton, D. und Fraenkel, D. G.** (1977): Yeast hexokinase mutants. *J Biol Chem* **10**: 4443-4444.
- Gancedo, C. und Serrano, R.** (1989): *The Yeasts* (Rose, A. H., and Harrison, I. S., eds) 205-259, Academic Press, London.
- Gasmi, N., Jacques, P.-E., Klimova, N., Guo, X., Ricciardi, A., Robert, F. und Turcotte, B.** (2014): The switch from fermentation to respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the *Ert1* transcriptional activator/repressor. *Genetics* **198**: 547-560.

- Georis, I., Krijger, J.J., Breunig, K. D. und Vandenhauten, J.** (2000): Differences in regulation of yeast gluconeogenesis of *PCK1* and *FBP1* genes in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet* **264**: 193-203.
- Georis, I., Cassart, J.-P., Breunig, K. D. und Vandenhauten, J.** (1999): Transcription of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *INV1* is glucose-repressed independently from *MIG1*. *Mol Gen Genet* **261**: 862-870.
- Gietz, R. D. und Sugino, A.** (1988): New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **2**: 527-534.
- Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P. P. und Ferrero, I.** (1996): *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**: 316-326.
- González Siso, M. I., Ramil, E., Cerdán, M. E. und Freire-Picos, M. A.** (1996): Respiratory fermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology* **18**: 585-591.
- Gould, T. A., van de Langemheen, H., Muñoz-Elías, E. J., McKinney, J. D. und Sacchettini, J. C.** (2006): Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **61**: 940-947.
- Grauslund, M., Lopes, J. M. und Rønnow, B.** (1999): Expression of *GUT1*, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators *Adr1p*, *Ino2p* and *Ino4p* and the negative regulator *Opi1p* in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Res* **27**: 4391-4398.
- Graybill, E. R., Rouhier, M. F., Kirby, C. E. und Hawes, J. W.** (2007): Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **465**: 26-37.
- Gurevich, R., Smolikov, S., Maddar, H. und Krauskopf, A.** (2003): Mutant telomeres inhibit transcriptional silencing at native telomeres of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Genet Genomics* **268**: 729-738.
- Gurvitz, A., Hiltunen, J. K., Erdmann, R., Hamilton, B., Hartig, A., Ruis, H. und Rottensteiner, H.** (2001): *Saccharomyces cerevisiae* *Adr1p* governs fatty acid beta-oxidation and peroxisome proliferation by regulating *POX1* and *PEX11*. *J Biol Chem* **276**: 31825-31830.
- Hagman, A. und Piškur, J.** (2015): A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS One* **10**: e0116942.
- Hagman, A., Säll, T., Compagno, C. und Piškur, J.** (2013): Yeast "make-accumulate-consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One* **8**: e68734.
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sogliocco, F. und Boucherie, H.** (2001): The transcriptional activator *Cat8p* provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 76-85.

- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., Hedges, S. B.** (2001): Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**: 1129-1133.
- Hedbacker, K. und Carlson, M.** (2008): SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* **13**: 2408-2420.
- Hedges, D., Proft, M. und Entian, K. D.** (1995): *CAT8* a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 1915-1922.
- Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L. und Shoe, J. L.** (2004): A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* **4**: 2.
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J. L., Zamboni, N., Westermann, B., et al.** (2012): Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* **337**: 93-96.
- Higuchi, T., Watanabe, Y. und Yamamoto, M.** (2002): Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* **22**: 1-11.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., et al.** (2002): Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- Hoffman, C. S. und Winston, F.** (1987): A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **2-3**: 267-272.
- Holmberg, S. und Schjerling, P.** (1996): Cha4p of *Saccharomyces cerevisiae* activates transcription via serine/threonine response elements. *Genetics* **144**: 467-478.
- Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D. und Carlson, M.** (2003): Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8839-8843.
- Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J., et al.** (2005): Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science* **309**: 938-940.
- Iyer, V. und Struhl, K.** (1995): Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *EMBO J* **14**: 2570-2579.
- Jablonowski, D., Fichtner, L., Martin, V. J., Klassen, R., Meinhardt, F., Stark, M. J. und Schaffrath, R.** (2001): *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zymocin receptor. *Yeast* **14**: 1285-1299.
- Jacoby, J., Hollenberg, C. P. und Heinisch, J. J.** (1993): Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol Microbiol* **10**: 867-876.
- Jaillon, O., Aury, J. M. und Wincker, P.** (2009): "Changing by doubling", the impact of whole genome duplications in the evolution of eukaryotes. *C R Biol* **332**: 241-253.

- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., et al.** (2006): Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.
- Jiang, R. und Carlson, M.** (1997): The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* **17**: 2099-2106.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. und Felsenfeld, G.** (2009): H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* **41**: 941-945.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. und Wood, P. M.** (2001): Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 179-195.
- Ju, Q. D., Morrow, B. E. und Warner, J. R.** (1990): REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essential for growth and bears some resemblance to the oncogene myb. *Mol. Cell. Biol.* (10): 5226-5234.
- Jutras, B. L., Verma, A. und Stevenson, B.** (2013): Identification of novel DNA binding proteins using DNA affinity chromatography-pulldown. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 1: Unit 1F1.
- Kacherovsky, N., Tachibana, C., Amos, E., Fox, D. 3rd und Young, E. T.** (2008): Promoter binding by the Adr1 transcriptional activator may be regulated by phosphorylation in the DNA-binding region. *PLoS One* **9**: e3213.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. und Hardie, D. G.** (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**: 15-25.
- Kaur, R., Ma, B. und Cormack, B. P.** (2007): A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- Kellis, M., Birren, B. W. und Lander, E. S.** (2004): Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**: 617-624.
- Kettner, K., Muller, E.C., Otto, A., Rödel, G., Breunig, K. D. und Kriegel, T. M.** (2007): Identification and characterization of a novel glucose-phosphorylating enzyme in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **7**: 683-692.
- Kiers, J., Zeeman, A. M., Luttik, M., Thiele, C., Castrillo, J. I., Steensma, H. Y., et al.** (1998): Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* **14**: 459-469.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E.** (1999): Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972.
- Koerber, R. T., Rhee, H. S., Jiang, C. und Pugh, B. F.** (2009): Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell* **35**: 889-902.
- Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. und Rhodes, D.** (1996): The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* **1**: 125-136.

- Köppen, A.** (2015): Analyse der Regulation des gluconeogenetischen Gens *FBP1* in *Kluyveromyces lactis*. Masterarbeit.
- Kratzer, S. und Schuller, H. J.** (1997): Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, *ACS1*, by the positive regulators *CAT8* and *ADR1* and the pleiotropic repressor *UME6*. *Mol Microbiol* **26**: 631-641.
- Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wunschmann, J., Becker, S. und Rodel, G.** (2006): *YIL042c* and *YOR090c* encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett* **580**: 2553-60.
- Krijger, J.-J.** (2002): Carbon Source-Responsive Elements and gene regulation by *CAT8* and *SIP4* in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Dissertation. Universität Halle-Wittenberg.
- Kuhn, K. M., DeRisi, J. L., Brown, P. O. und Sarnow, P.** (2001): Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol and Cell Biol* **21**: 916-927.
- Kulkens, T., van der Sande, C. A., Dekker, A. F., van Heerikhuizen, H. und Planta, R. J.** (1992): A system to study transcription by yeast RNA polymerase I within the chromosomal context: functional analysis of the ribosomal DNA enhancer and the RBP1/REB1 binding sites. *EMBO J* **11**: 4665-4674.
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y. und Yamamoto, M.** (2000): A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11(+)* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Cell Biol* **11**: 3205-3217.
- Kusche, D., Kuhnt, K., Ruebesam, K., Rohrer, C., Nierop, A. F., Jahreis, G. und Baars, T.** (2015): Fatty acid profiles and antioxidants of organic and conventional milk from low- and high-input systems during outdoor period. *J Sci Food Agric* **95**: 529-539.
- Kussell, E. und Leibler, S.** (2005): Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* **309**: 2075-2078.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lesage, P., Yang, X. und Carlson, M.** (1996): Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol Cell Biol* **16**: 1921-1928.
- Leskovac, V., Trivić, S. und Pericin, D.** (2002): The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2**: 481-494.
- Lin, Z. und Li, W. H.** (2011): Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. *Mol Biol Evol* **28**: 131-142.
- Lodi, T., Saliola, M., Donnini, D. und Goffrini, P.** (2001): Three target genes for the transcriptional activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: acetyl coenzyme A synthetase genes *KIACS1* and *KIACS2* and lactate permease gene *KIJEN1*. *J Bacteriol* **183**: 5257-5261.
- Löoke, M., Kristjuhan, K. und Kristjuhan, A.** (2011): Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* **5**: 325-328.

- Louis, V. L., Despons, L., Friedrich, A., Martin, T., Durrens, P., Casarégola, S., et al.** (2012): *Pichia sorbitophila*, an interspecies yeast hybrid, reveals early steps of genome resolution after polyploidization. *G3* **2**: 299-311.
- Ludin, K., Jiang, R. und Carlson, M.** (1998): Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6245-6250.
- Malluta, E. F., Decker, P. und Stambuk, B. U.** (2000): The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Basic Microbiol* **40**: 199-205.
- Martínez-Montañés, F., Rienzo, A., Poveda-Huertes, D., Pascual-Ahuir, A. und Proft, M.** (2013): Activator and repressor functions of the Mot3 transcription factor in the osmostress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **12**: 636-647.
- Martins, A. M., Cordeiro, C. A. und, Ponces Freire, A. M.** (2001): In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **499**: 41-44.
- Martchenko, M., Levitin, A., Hogues, H., Nantel, A. und Whiteway, M.** (2007): Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Curr Biol* **17**: 1007-1013.
- Massey, S. E., Moura, G., Beltrao, P., Almeida, R., Garey, J. R., Tuite, M. F. und Santos, M. A.** (2003): Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp. *Genome Res* **13**: 544-557.
- Mates, N., Kettner, K., Heidenreich, F., Pursche, T., Migotti, R., Kahlert, G., et al.** (2014): Proteomic and functional consequences of hexokinase deficiency in glucose-repressible *Kluyveromyces lactis*. *Mol Cell Proteomics* **3**: 860-875.
- Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartney, R. R., et al.** (2011): ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **14**: 707-714.
- Mehlgarten, C., Krijger, J.-J., Lemnian, I., Gohr, A., Kaspar, L., Diesing, A.-K., et al.** (2015): Divergent Evolution of the Transcriptional Network Controlled by Snf1-Interacting Protein Sip4 in Budding Yeasts. *PLoS One* **5**: 1065-1069.
- Melo, A. M., Duarte, M. und Videira, A.** (1999): Primary structure and characterization of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1412**: 282-287.
- Mercado, J. J., Smith, R., Sogliocco, F. A., Brown, A. J. und Gancedo, J. M.** (1994): The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur J Biochem* **224**: 473-481.
- Mercado, J. J. und Gancedo, J. M.** (1992): Regulatory regions in the yeast *FBP1* and *PCK1* genes. *FEBS Lett* **2**: 110-114.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. und Compagno, C.** (2007): Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* **274**: 976-989.
- Michels, P. A. und Rigden, D. J.** (2006): Evolutionary analysis of fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *IUBMB Life* **58**: 133-141.

- Millar, C. B. und Grunstein, M.** (2006): Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 657-666.
- Minard, K. I. und McAlister-Henn, L.** (2001): Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic Biol Med* **31**: 832-843.
- Miranda, I., Silva, R. und Santos, M. A.** (2006): Evolution of the genetic code in yeasts. *Yeast* **23**: 203-213.
- Momcilovic, M., Iram, S. H., Liu, Y. und Carlson, M.** (2008): Roles of the glycogen-binding domain and Snf4 in glucose inhibition of SNF1 protein kinase. *J Biol Chem* **283**: 19521-19529.
- Morawiec, E., Wichtowska, D., Graczyk, D., Conesa, C., Lefebvre, O. und Boguta, M.** (2013): Maf1, repressor of tRNA transcription, is involved in the control of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **526**: 16-22.
- Morrow, B. E., Ju, Q. und Warner, J. R.** (1993): A bipartite DNA-binding domain in yeast Reb1p. *Mol Cell Biol* **2**: 1173-1182.
- Morrow, B. E., Ju, Q. und Warner, J. R.** (1989): Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *J Biol Chem* **264**: 9061-9068.
- Mulder, W., Scholten, I. H. und Grivell, L. A.** (1995): Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* despite similar promoter structures. *Mol Microbiol* **17**: 813-824.
- Müller, S., Zimmermann, F. K. und Boles, E.** (1997): Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. *Microbiology* **143**: 3055-3061.
- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M.** (1994): Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acid Res* **25**: 5767-5768.
- Murphy, R. L., Andrianopoulos, A., Davis, M. A. und Hynes, M. J.** (1997): Identification of amdX, a new Cys-2-His-2 (C2H2) zinc-finger gene involved in the regulation of the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **23**: 591-602.
- Nath, N., McCartney, R. R. und Schmidt, M. C.** (2003): Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol Cell Biol* **23**: 3909-3917.
- New, A. M., Cerulus, B., Govers, S. K., Perez-Samper, G., Zhu, B., Boogmans, S., et al.** (2014): Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS Biol* **12**: e1001764.
- Ohno, S.** (1970): *Evolution by Gene Duplication*. George Allen and Unwin: London.
- Oliveira, A. P., Ludwig, C., Picotti, P., Kogadeeva, M., Aebersold, R. und Sauer, U.** (2012): Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol Syst Biol* **8**: 623.
- Opgen-Rhein, R. und Strimmer, K.** (2007): Accurate ranking of differentially expressed genes by a distribution-free shrinkage approach. *Stat Appl Genet Mol Biol* **6**: Article 9.
- Otzen, C., Bardl, B., Jacobsen, I. D., Nett, M. und Brock, M.** (2014): *Candida albicans* utilizes a modified  $\beta$ -oxidation pathway for the degradation of toxic propionyl-CoA. *J Biol Chem* **289**: 8151-8169.



- Pachkov, M., Erb, I., Molina, N. und van Nimwegen, E.** (2007): SwissRegulon: a database of genome-wide annotations of regulatory sites. *Nucleic Acids Res. Database issue*: D127-131.
- Pan, S.-J.** (2011): The roles of the methylcitrate cycle and nicotinamide adenine dinucleotide starvation in *Candida glabrata* virulence. Dissertation. Johns Hopkins University, Baltimore.
- Papanikolaou, S., Beopoulos, A., Koletti, A., Thevenieau, F., Koutinas, A. A., Nicaud, J. M. und Aggelis, G.** (2013): Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* **168**: 303-314.
- Parua, P. K., Dombek, K. M. und Young, E. T.** (2014): Yeast 14-3-3 protein functions as a comodulator of transcription by inhibiting coactivator functions. *J Biol Chem* **289**: 35542-35560.
- Parua, P. K., Ratnakumar, S., Braun, K. A., Dombek, K. M., Arms, E., Ryan, P. M. und Young, E. T.** (2010): 14-3-3 (Bmh) proteins inhibit transcription activation by Adr1 through direct binding to its regulatory domain. *Mol Cell Biol* **30**: 5273-5283.
- Peng, Y. und Jahroudi, N.** (2002): The NFY transcription factor functions as a repressor and activator of the von Willebrand factor promoter. *Blood* **99**: 2408-2417.
- Piškur, J. und Langkjaer, R. B.** (2004): Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Mol Microbiol* **53**: 381-389.
- Prielhofer, R., Cartwright, S. P., Graf, A. B., Valli, M., Bill, R. M., Mattanovich, D. und Gasser, B.** (2015): *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC Genomics* **16**: 167.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H. und Van Dijken, J. P.** (1996): Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
- Pronk, J. T., van der Linden-Beuman, A., Verduyn, C., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P.** (1994): Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology* **140** (Pt 4): 717-722.
- Pryszcz, L. P., Nemeth, T., Gacser, A. und Gabaldon, T.** (2014): Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. *Genome Biol Evol* **6**: 1069-1078.
- Radman-Livaja, M. und Rando, O. J.** (2010): Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? *Dev Biol* **339**: 258-266.
- Rahner, A., Hiesinger, M. und Schuller, H. J.** (1999): Dereglulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **34**: 146-156.
- Rahner, A., Scholer, A., Martens, E., Gollwitzer, B. und Schuller, H. J.** (1996): Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene *CAT8*. *Nucleic Acids Res* **24**: 2331-2337.
- Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., et al.** (2005): Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**: 233-248.

- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K. D. und Prieto, J. A.** (1998): Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol* **18**: 2940-2948.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M. und Entian, K. D.** (1997): Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol Cell Biol* **17**: 2502-2510.
- Ratledge, C. und Evans, C. T.** (1993): Lipids and their metabolism. "The yeasts" Vol. 3 (2<sup>nd</sup> edition): 367-455.
- Ratnakumar, S. und Young, E. T.** (2010): Snf1 dependence of peroxisomal gene expression is mediated by Adr1. *J Biol Chem* **285**: 10703-10714.
- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E. und Young, E. T.** (2009): Snf1 controls the activity of Adr1 through dephosphorylation of Ser230. *Genetics* **182**: 735-745.
- Reifenberger, E., Boles, E. und Ciriacy, M.** (1997): Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* **245**: 324-333.
- Renny-Byfield, S., Gallagher, J. P., Grover, C. E., Szadkowski, E., Page, J. T., Udall, J. A., et al.** (2014): Ancient gene duplicates in *Gossypium* (cotton) exhibit near-complete expression divergence. *Genome Biol Evol* **6**: 559-571.
- Rhee, H. S. und Pugh, B. F.** (2011): Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* **147**: 1408-1419.
- Rine, J. und Herskowitz, I.** (1987): Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**: 9-22.
- Rippert, D., Backhaus, K., Rodicio, R. und Heinisch, J. J.** (2017): Cell wall synthesis and central carbohydrate metabolism are interconnected by the SNF1/Mig1 pathway in *Kluyveromyces lactis*. *Eur J Cell Biol* **96**: 70-81.
- Rischatsch, R.** (2007): Transcriptional profiling of the model organism *A. gossypii*: Comparison of life cycle stages and transcription factor deletions. Dissertation. Universität Basel.
- Roberts, G. G. und Hudson, A. P.** (2006): Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. *Mol Gen Genomics* **276**: 170-186.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. und Mesirov, J. P.** (2011): Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24-26.
- Rodicio, R., López, M. L., Cuadrado, S., Cid, A. F., Redruello, B., Morena, F., et al.** (2008): Differential control of isocitrate lyase gene transcription by non-fermentable carbon sources in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett* **5**: 549-557.
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P. und Moreno, F.** (2001): The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **355**: 625-631.

- Rodrigues, F., Ludovico, P. und Leão, C.** (2006): Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: Rosa CA, Peter G, editors. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast: 101-121.
- Rodríguez-Enríquez, S., Pérez-Gallardo, J. C., Avilés-Salas, A., Marín-Hernández, A., Carreño-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V. und Moreno-Sánchez, R.** (2008): Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol* **216**: 189-197.
- Roetzer, A., Gabaldón, T. und Schüller, C.** (2011): From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Lett* **314**: 1-9.
- Rolland, S., Hnatova, M., Lemaire, M., Leal-Sánchez, J. und Wesolowski-Louvel, M.** (2006): Connection between the Rag4 glucose sensor and the *KlRgt1* repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **174**: 617-626.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. und Capaldi, R.A.** (2004): Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**: 985-993.
- Rottensteiner, H., Wabnegger, L., Erdmann, R., Hamilton, B., Ruis, H., Hartig, A. und Gurvitz, A.** (2003): *Saccharomyces cerevisiae* *PIP2* mediating oleic acid induction and peroxisome proliferation is regulated by *Adr1p* and *Pip2p-Oaf1p*. *J Biol Chem* **278**: 27605-27611.
- Rudoni, S., Mauri, I., Ceriani, M., Coccetti, P. und Martegani, E.** (2000): The overexpression of the *CDC25* gene of *Saccharomyces cerevisiae* causes a derepression of GAL system and an increase of *GAL4* transcription. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 215-224.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., et al.** (2004): The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539-5545.
- Ruiz, A., Xu, X. und Carlson, M.** (2013): Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **288**: 31052-31058.
- Ruiz, Al, Xu, X. und Carlson, M.** (2011): Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 6349-6354.
- Sabet, N., Tong, F., Madigan, J. P., Volo, S., Smith, M. M. und Morse, R. H.** (2003): Global and specific transcriptional repression by the histone H3 amino terminus in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4084-4089.
- Sakabe, N. J., Aneas, I., Shen, T., Shokri, L., Park, S., Bulyk, M. L., et al.** (2012): Dual transcriptional activator and repressor roles of TBX20 regulate adult cardiac structure and function. *Hum Mol Genet* **21**: 2194-2204.
- Saliola, M., Shuster, J. R. und Falcone, C.** (1990): The alcohol dehydrogenase system in the yeast, *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **6**: 193-204.

- Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. und Carlson, M.** (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol* **20**: 1321-1328.
- Schabort, du T. W., Letebele, P. K., Steyn, L., Kilian, S. G. und du Preez, J. C.** (2016): Differential RNA-seq, multi-network analysis and metabolic regulation analysis of *Kluyveromyces marxianus* reveals a compartmentalised response to xylose. *PLoS One* **11**: e0156242.
- Schmidt, T.** (1995): Die Regulation der basalen Genexpression der Hefe- $\beta$ -Galaktosidase. Dissertation. Universität Halle-Wittenberg.
- Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M. und Wolf, D. H.** (1994): Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* **349**: 270-274.
- Schuller, H. J.** (2003): Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**: 139-160.
- Shain, D. H., Salvatore, C. und Denis, C. L.** (1992): Evolution of the alcohol dehydrogenase (*ADH*) genes in yeast: characterization of a fourth *ADH* in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet* **232**: 479-488.
- Sherman, D. J., Martin, T., Nikolski, M., Cayla, C., Souciet, J. L., Durrens, P.; Génolevures Consortium** (2009): Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acid Res. Database Issue*: D550-4.
- Shore, D. und Nasmyth, K.** (1987): Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**: 721-732.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D. G., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al.** (2011): *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. *Mol Syst Biol* **7**: 539.
- Sil, A. und Herskowitz, I.** (1996): Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**: 711-712.
- Simon, M. M., Pavlik, P., Hartig, A., Binder, M., Ruis, H., Cook, W. J., et al.** (1995): A C-terminal region of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor Adr1 plays an important role in the regulation of peroxisome proliferation by fatty acids. *Mol Gen Genet* **249**: 289-296.
- Simon, M., Binder, M., Adam, G., Hartig, A. und Ruis, H.** (1992): Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by *ADR1*, *SNF1* (*CAT1*, *CCR1*) and *SNF4* (*CAT3*). *Yeast* **8**: 303-309.
- Simon, M., Adam, G., Rapatz, W., Spevak, W. und Ruis, H.** (1991): The *Saccharomyces cerevisiae* *Adr1* gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol Cell Biol* **11**: 699-704.
- Sitzmann, J., Noben-Trauth, K., Kamano, H. und Klempnauer, K. H.** (1996): Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene* **9**: 1889-1894.

- Slekar, K. H., Kosman, D. J. und Culotta, V. C.** (1996): The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem* **27**: 28831-28836.
- Smart, K. A.** (2007): Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. *Yeast* **24**: 993-1013.
- Smirnoff, N. und Cumbes, Q.** (1989): Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., et al.** (2000): A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6658-6663.
- Snoek, I. H. und Steensma, H. Y. (2006): Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *FEMS Yeast Res* **6**: 393-403.
- Soontornngun, N., Baramée, S., Tangsombatvichit, C., Thepnok, P., Cheevadhanarak, S., Robert, F. und Turcotte, B.** (2012): Genome-wide location analysis reveals an important overlap between the targets of the yeast transcriptional regulators Rds2 and Adr1. *Biochem Biophys Res Commun* **423**: 632-637.
- Soontornngun, N., Laroche, M., Drouin, S., Robert, F. und Turcotte, B.** (2007): Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol Cell Biol* **27**: 7895-7905.
- Sprague, G. F. und Cronan, J. E.** (1977): Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *J Bacteriol* **129**: 1335-1342.
- Storchova, Z. und Pellmann, D.** (2004): From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 45-54.
- Struhl, K.** (1987): Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**: 295-297.
- Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J., Schmidt, M. C. und Hardie, D. G.** (2003): Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol* **13**: 1299-1305.
- Tabuchi, T. und Uchiyama, H.** (1975): Methylcitrate condensing and methylisocitrate cleaving enzymes; evidence for the pathway of oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via C7-tricarboxylic acids. *Agric Biol Chem* **39**: 2035-2042.
- Tachibana, C., Biddick, R., Law, G. L. und Young, E. T.** (2007): A poised initiation complex is activated by SNF1. *J Biol Chem* **282**: 37308-37315.
- Tachibana, C., Yoo, J.Y., Tagne, J. B., Kacherovsky, N., Lee, T. I. und Young, E. T.** (2005): Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol Cell Biol* **6**: 2138-2146.
- Tamanoi, F.** (2011): Ras Signaling in Yeast. *Genes Cancer* **2**: 210-215.
- Tarrio, N., Becerra, M., Cerdan, M. E. und Gonzales-Siso, M. I.** (2006a): Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **6**: 371-380.

- Tarrio, N., Cerdan, M. E. und Gonzales-Siso, M. I.** (2006b): Characterization of the second external alternative dehydrogenase from mitochondria of the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1476-1484.
- Tarrio, N., Diaz-Prado, S., Cerdan, M. E. und Gonzales-Siso, M. I.** (2005): The nuclear genes encoding the internal (*KIND11*) and external (*KINDE1*) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim Biophys Acta* **1707**: 199-210.
- Textor, S., Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Muller, U., Linder, M. I., Linder, D. und Buckel, W.** (1997): Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol* **168**: 428-436.
- Thomas, B. C., Pedersen, B. und Freeling, M.** (2006): Following tetraploidy in an *Arabidopsis* ancestor, genes were removed preferentially from one homeolog leaving clusters enriched in dose-sensitive genes. *Genome Res* **16**: 934-946.
- Thompson, D. A., Roy, S., Chan, M., Styczynski, M. P., Pfiffner, J., French, C., et al.** (2013): Evolutionary principles of modular gene regulation in yeasts. *eLife* **2**: e00603.
- Thukral, S. K., Eisen, A. und Young, E. T.** (1991): Two monomers of yeast transcription factor ADR1 bind a palindromic sequence symmetrically to activate *ADH2* expression. *Mol Cell Biol* **3**: 1566-1577.
- Thukral, S. K., Tavianini, M. A., Blumberg, H. und Young, E. T.** (1989): Localization of a Minimal Binding Domain and Activation Regions in Yeast Regulatory Protein ADR1. *Mol Cell Biol* **6**: 2360-2369.
- Tisi, R., Belotti, F., Paiardi, C., Brunetti, F. Martegani, E.** (2008): The budding yeast RasGEF Cdc25 reveals an unexpected nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 2363-2374.
- Todd, R. B., Andrianopoulos, A., Davis, M. A. und Hynes, M. J.** (1998): FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences. *EMBO J* **17**: 2042-2054.
- Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V. und Coccetti, P.** (2015): Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* **1850**: 620-627.
- Tsankov, A. M., Thompson, D. A., Socha, A., Regev, A. und Rando, O. J.** (2010): The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol* **8**: e1000414.
- Tu, J. und Carlson, M.** (1995): REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 5939-5946.
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F. und Soontorngun, N.** (2010): Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* **10**: 2-13.
- Usaite, R., Jewett, M. C., Oliveira, A. P., Yates, J. R. III, Olsson, L. und Nielsen, J.** (2009): Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. *Mol Syst Biol* **5**: 319.
- Van Bakel, H., van Werven, F. J., Radonjic, M., Brok, M. O., van Leenen, D., Holstege, F. C. P. und Marc Timmers, H. T.** (2008): Improved genome-wide localization by ChIP-chip using double-round T7 RNA polymerase-based amplification. *Nucleic Acids Res* **36**: e21.

- Van den Berg, M. A. und Steensma, H. Y.** (1995): *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur J Biochem* **231**: 704-713.
- Van Heusden, G. P.** (2009): 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **94**: 287-293.
- Van Hoeg, M. J. A. und Hogeweg, P.** (2009): Metabolic adaption after whole genome duplication. *Mol Biol Evol* **26**: 2441-253.
- Van Holde, K. E.** (1989): *Chromatin*. Springer, New York.
- Vincent, O. und Carlson, M.** (1998): Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J* **17**: 7002-7008.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H. und van Dijken, J. P.** (1990): Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**: S. 3785-3792.
- Vogel, C. und Marcotte, E. M.** (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**: 227-232.
- Von Jagow, G. und Klingenberg, M.** (1970): Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur J Biochem* **12**: 583-592.
- Wang, X., Cai, M., Shi, L., Wang, Q., Zhu, J., Wang, J., et al.** (2016): *PpNrg1* is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of *AOX1* promoter in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **38**: 291-298.
- Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K. D. und Fukuhara, H.** (1996): *Kluyveromyces lactis*. "Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook." Wolf, K. (Ed.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Wésolowski-Louvel, M., Goffrini, P. und Ferrero, I.** (1992): Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol Gen Genet* **233**: 89-96.
- Wojtczak, L.** (1996): The Crabtree effect: a new look at the old problem. *Acta Biochim Pol* **43**: 361-368.
- Wolfe, K. H. und Shields, D. C.** (1997): Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
- Wu, X., Hart, H., Cheng, C., Roach, P. J. und Tatchell, K.** (2001): Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type I involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**: 622-635.
- Young, E.T., Zhang, C., Shokat, K. M., Parua, P. K. und Braun, K. A.** (2012): The AMP-activated protein kinase Snf1 regulates transcription factor binding, RNA polymerase II activity, and mRNA stability of glucose-repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **287**: 29021-29034.
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C. und Ideker, T.** (2003): Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* **278**: 26146-26158.

**Young, E. T., Kacherovsky, N. und Van Riper, K.** (2002): Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *J Biol Chem* **277**: 38095-38103.

**Zeeman, A. M. und Steensma, H. Y.** (2003): The acetyl co-enzyme A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **20**: 13-23.

**Zenke, F. T., Zachariae, W., Lunkes, A. und Breunig, K. D.** (1993): Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol Cell Biol* **12**: 7566-7576.

**Zhang, N., Wu, J. und Oliver, S. G.** (2009): Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast. *Microbiology* **155** (Pt 5): 1690-1698.

**Zhong, J., Luo, K., Winter, P. S., Crawford, G. E., Iversen, E. S. und Hartemink, A. J.** (2016): Mapping nucleosome positions using DNase-seq. *Genome Res* **26**: 351-364.



## 7. Anhang

Tabelle A1: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pXY01	<b>pJET1.2::P<sub>KIFBP1</sub>(200-1)</b> pJET1.2-Derivat; Insertion eines 200bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-200 bis -1) (PCR mit XY13/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6)
pXY05	<b>pJET1.2::P<sub>KIFBP1</sub>(1000-1)</b> pJET1.2-Derivat; Insertion des P <sub>KIFBP1</sub> (-1000 bis -1) (PCR mit XY09/XY13 an <i>K. lactis</i> JA6)
pXY15	<b>pTS32X::GUS</b> pTS32X-Derivat; Insertion des <i>GUS</i> -Gens (PCR mit XY25/XY26 an KEp6KHT3GUS, Klonierung über <i>SpeI</i> und <i>SacII</i> in pTS23X)
pXY16	<b>pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(200-1)-GUS</b> pXY15-Derivat; Fusion eines 200 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-200 bis -1) mit <i>GUS</i> -Gen (PCR mit XY13/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>Sall</i> und <i>XmaI</i> in pXY15) (Abbildung A2)
pXY17	<b>pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(400-1)-GUS</b> pXY15-Derivat; Fusion eines 400 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-400 bis -1) mit <i>GUS</i> -Gen (PCR mit XY12/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>Sall</i> und <i>XmaI</i> in pXY15) (Abbildung A2)
pXY18	<b>pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(600-1)-GUS</b> pXY15-Derivat; Fusion eines 600 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-600 bis -1) mit <i>GUS</i> -Gen (PCR mit XY11/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>Sall</i> und <i>XmaI</i> in pXY15) (Abbildung A2)
pXY19	<b>pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(800-1)-GUS</b> pXY15-Derivat; Fusion eines 800 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-800 bis -1) mit <i>GUS</i> -Gen (PCR mit XY10/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>Sall</i> und <i>XmaI</i> in pXY15) (Abbildung A2)
pXY20	<b>pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(1000-1)-GUS</b> pXY15-Derivat; Fusion des P <sub>KIFBP1</sub> (-1000 bis -1) mit <i>GUS</i> -Gen (PCR mit XY09/XY14 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>Sall</i> und <i>XmaI</i> in pXY15) (Abbildung A2)
pXY33	<b>pTS32X::P<sub>ScCYC1</sub>UASΔ-GUS</b> pTS32X-Derivat; Fusion eines 566 bp großen P <sub>ScCYC1</sub> -Fragments (-1000 bis -1, ΔUAS (-679 bis -246)) mit <i>GUS</i> -Gen (dafür Deletion der <i>XhoI</i> -Schnittstelle von pXY05 über <i>XhoI</i> -Restriktion, <i>Klenow fill-in</i> und Re-Ligation (=pXY30), PCR für P <sub>ScCYC1</sub> mit XY38/XY39 an <i>S. cerevisiae</i> W303-1a, Klonierung PCR-Produkt in mit <i>Sall</i> und <i>XbaI</i> linearisiertes pXY30, Deletion der UAS <sub>ScCYC1</sub> über <i>XhoI</i> -Restriktion (=pXY32), Klonierung P <sub>ScCYC1</sub> UASΔ über <i>Sall</i> und <i>SpeI</i> in pXY20)
pXY40	<b>pTS32X::P(800-200)-GUS</b> pXY33-Derivat; Insertion eines 600 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-800 bis -200) in <i>XhoI</i> -Schnittstelle des P <sub>ScCYC1</sub> UASΔ (=p800-200) (PCR mit XY53/XY55 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>XhoI</i> in pXY30 (=pXY37), Klonierung über <i>Sall</i> und <i>SpeI</i> in pXY20) (Abbildung A2)
pXY41	<b>pTS32X::P(800-400)-GUS</b> pXY33-Derivat; Insertion eines 400 bp großen P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-800 bis -400) in <i>XhoI</i> -Schnittstelle des P <sub>ScCYC1</sub> UASΔ (=p800-400) (PCR mit XY53/XY56 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>XhoI</i> in pXY30 (=pXY38), Klonierung über <i>Sall</i> und <i>SpeI</i> in pXY20) (Abbildung A2)
pXY42	<b>pTS32X::P(800-600)-GUS</b> pXY33-Derivat; Insertion eines 200 bp großes P <sub>KIFBP1</sub> -Fragments (-800 bis -600) in <i>XhoI</i> -Schnittstelle des P <sub>ScCYC1</sub> UASΔ (=p800-600) (PCR mit XY53/XY57 an <i>K. lactis</i> JA6, Klonierung über <i>XhoI</i> in pXY30 (=pXY39), Klonierung über <i>Sall</i> und <i>SpeI</i> in pXY20) (Abbildung A2)

- pXY62 YEplac112::Kladr1 $\Delta$**   
 YEplac112-Derivat; dient Deletion von *KIADR1*; enthält *KIADR1*-Lokus (-1213 bis 4960), wobei ORF durch Insertion des *ScURA3*-Lokus (-522 bis 890) in *Van91I*-Schnittstelle disruptiert wurde  
 (Klonierung des *KIADR1*-Lokus in zwei Teilen (Abbildung A1): 1. PCR mit *KIADR1*-ORF\_FW/XY20 an *K. lactis* JA6, Klonierung über *XbaI* und *Acc65I* in YEplac195 (=pXY23); 2. PCR mit XY19/*KIADR1*-ORF\_RV an *K. lactis* JA6, Klonierung über *BamHI* und *XbaI* in pXY23 (=pXY24); Klonierung *KIADR1*-Lokus über *Acc65I* und *XbaI* in YEplac112 (=pXY61); PCR mit *ScURA3*-FW-Van91I/*ScURA3*-RV-Van91I an *S. cerevisiae* LL20, Insertion *ScURA3* in *KIADR1* über *Van91I* in pXY61)
- pXY66 YEplac195::Klhap4 $\Delta$**   
 YEplac195::*KIHAP4*-Derivat; dient Deletion von *KIHAP4*; enthält *KIHAP4*-Lokus (-852 bis 2614), wobei ORF durch Insertion des *ScURA3*-Lokus (-522 bis 890) in *SexAI/EcoNI*-Schnittstelle disruptiert wurde  
 (PCR mit *ScURA3*-FW-SexAI und *ScURA3*-RV-EcoNI an *S. cerevisiae* LL20, Insertion *ScURA3* über *SexAI* und *EcoNI* in YEplac195::*KIHAP4*)
- pXY74 YEplac195::P<sub>KIFBP1</sub>-GUS**  
 YEplac195-Derivat; Fusion des *KIFBP1*-Promotors (-1000 bis -1) mit *GUS*-Gen  
 (Deletion *XmaI*-Schnittstelle in KEp6 über *XmaI*-Restriktion, *Klenow fill-in* und Re-Ligation (=KEp6 $\Delta$ Xma), PCR *GUS*-Gen mit XY23/XY24 an KEp6KHT3GUS und Insertion über *Sall* und *HindIII* in KEp6 $\Delta$ Xma (=pXY08), Insertion des p800-600 *ScCYC1-KIFBP1*-Fusionspromotors aus pXY42 über *Sall* und *SnaBI* in pXY08 (=pXY72); Klonierung von p800-600-GUS aus pXY72 über *HindIII* und *Sall* in YEplac195 (=pXY73); Klonierung *KIFBP1*-Promotor (-1000 bis -1) aus pXY20 über *SpeI* und *Sall* in pXY73)
- pXY86 pKATUC4::(HA)<sub>3</sub>-KIADR1**  
 pKATUC4-Derivat; dient (HA)<sub>3</sub>-Epitopmarkierung von *KIADR1*;  
 enthält *KIADR1*-Lokus (-1213 bis 4960), wobei für N-terminale Epitopmarkierung ein (HA)<sub>3</sub> vor Start-ATG eingefügt wurde  
 (InFusion-Klonierung von 3'-*KIADR1* (PCR mit XY70/XY184 an *K. lactis* JA6), (HA)<sub>3</sub> (PCR mit XY185/XY186 an pYM2) und des restlichen *KIADR1*-Lokus (PCR mit XY187/XY32 an *K. lactis* JA6) über *SacI* und *SphI* in pKATUC4)
- pXY89 pTS32X::P<sub>KIICL1</sub>-GUS**  
 pTS32X-Derivat; Fusion des *KIICL1*-Promotors (-1195 bis -1) mit *GUS*-Gen  
 (PCR mit XY193/XY194 an *K. lactis* JA6, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY18)
- pXY93 pTS32X::P<sub>KIADR1</sub>-BD<sub>KIADR1</sub>-T<sub>TEF</sub>**  
 pTS32X-Derivat; Fusion des *KIADR1*-Promotors (-1500 bis -1) und der *KIADR1*-Bindedomäne (51 bis 687; AS 18-229) mit *TEF*-Terminator  
 (*KIADR1*-BD amplifiziert mit XY202/XY203 an *K. lactis* JA6, Insertion über *AscI* und *NotI* in pTS32X::pADH1-PR8-tTEF (=pXY91); *P<sub>KIADR1</sub>* amplifiziert mit XY204/XY205 an *K. lactis* JA6, Insertion über *SpeI* und *SgsI* in pXY91)
- pXY101 YEplac195::P<sub>ScFBP1</sub>-GUS**  
 pXY74-Derivat; Fusion des *ScFBP1*-Promotors (-1000 bis -1) mit *GUS*-Gen  
 (PCR mit XY224/XY225 an *S. cerevisiae* W303-1a, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY74)
- pXY102 YCplac33::KIADR1**  
 YCplac33-Derivat; Insertion des *KIADR1* Lokus (-1213 bis 4960)  
 (Klonierung *KIADR1* Lokus aus pXY24 (siehe pXY62) über *Sall* und *Acc65I* in YCplac33)
- pXY106 pTS32X::P<sub>KIICL1-Adr1-1 $\Delta$</sub> -GUS**  
 pXY89-Derivat; Fusion des *KIICL1*-Promotors (-1195 bis -1) mit *GUS*-Gen, wobei die potentielle *KIADR1*-Bindestelle I (-956 bis -952) deletiert ist  
 (PCR mit XY193/XY226 und XY228/XY194 an pXY89, Fusions-PCR an diesen PCR-Produkten mit XY193/XY194, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY20)
- pXY107 pTS32X::P<sub>KIICL1-Adr1-2 $\Delta$</sub> -GUS**  
 pXY89-Derivat; Fusion des *KIICL1*-Promotors (-1195 bis -1) mit *GUS*-Gen, wobei die

- potentielle *KIADR1*-Bindestelle II (- 721 bis -717) deletiert ist  
(PCR mit XY193/XY229 und XY227/XY194 an pXY89, Fusions-PCR an diesen PCR-Produkten mit XY193/XY194, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY20)
- pXY108 pTS32X::P<sub>KIICL1-Adr1-1,2Δ</sub>-GUS**  
pXY89-Derivat; Fusion des *KIICL1*-Promotors (-1195 bis -1) mit *GUS*-Gen, wobei zwei potentielle *KIADR1*-Bindestellen (I: -956 bis -952; II: - 721 bis -717) deletiert sind  
(PCR mit XY193/XY229 an pXY106 und XY227/XY194 an pXY89, Fusions-PCR an diesen PCR-Produkten mit XY193/XY194, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY20)
- pXY112 plac9-KanMX**  
pBSKG4-ScURA3-Derivat; dient Deletion von *KIGAL4*;  
*ScURA3*-Disruptionskassette wurde ausgetauscht mit *KanMX*-Kassette  
(über InFusion-Klonierung, Amplifizierung mit XY259/XY260 an *S. cerevisiae fbp1::KanMX* (Euroscarf Collection) in mit *Eco88I* und *CpoI* linearisiertes pBSKG4-ScURA3)
- pXY113 pGBD (pKATUC4::P<sub>ScMET17</sub>(HA)<sub>3</sub>-BD<sub>ScGAL4</sub>)**  
pKATUC4-Derivat; InFusion-Klonierung des *ScMET17*-Promotors (-391 bis -1), (HA)<sub>3</sub>-Epitop und der *ScGAL4*-Bindedomäne (+1 bis +441; AS 1-147)  
(über InFusion-Klonierung, P<sub>ScMET17</sub> amplifiziert mit XY246/XY247 an *S. cerevisiae* W303-1a, (HA)<sub>3</sub>-Epitop amplifiziert mit XY185/XY186 an pXY86 und *ScGAL4*-BD amplifiziert mit XY242/XY263 an pGBKT7, Klonierung in mit *SacI* und *SphI* linearisierten pKATUC4)
- pXY114 pGBD-SIP4 (pKATUC4::P<sub>ScMET17</sub>(HA)<sub>3</sub>-BD<sub>ScGAL4</sub>-KISIP4<sub>93-717</sub>-T<sub>ScMET17</sub>)**  
pXY113-Derivat; Insertion eines Teils von *KISIP4* (277 bis 2154; AS 93-717) und des *ScMET17* Terminators (+1336 bis +1736)  
(über InFusion-Klonierung, Teil des *KISIP4* ORFs amplifiziert mit XY264/XY265 an pGP3HA und des *ScMET17*-Terminator amplifiziert mit XY266/XY267 an *S. cerevisiae* W303-1a, Klonierung in mit *SacI* linearisiertes pXY113)
- pXY125 pKATUC4::(HA)<sub>3</sub>-KIADR1-P108L**  
pXY86-Derivat Mutation in der DNA-Bindedomäne von *KIADR1* durch Substitution von Cytosin (+323) zu Thymin und damit Prolin 108 (CCC) zu Leucin (CTC)  
(über Primer-vermittelte Mutagenese mit XY275 an pJET::KIADR1' (Abbildung A1) (=pJET::KIADR1-P108L). Austausch WT-KIADR1 mit KIADR1-P108L über InFusion-Klonierung, Amplifizierung KIADR1-P108L mit XY292/XY293 an pJET::KIADR1'-P108L, Klonierung in mit *Cfr42I* und *Van91I* linearisiertes pXY86)
- pXY126 pKATUC4::(HA)<sub>3</sub>-KIADR1-P118L**  
pXY86-Derivat; Mutation in der DNA-Bindedomäne von *KIADR1* durch Substitution von Cytosin +353 zu Thymin und damit Prolin 118 (CCC) zu Leucin (CTC)  
(über Primer-vermittelte Mutagenese mit XY276 an pJET::KIADR1' (Abbildung A1) (=pJET::KIADR1-P118L). Austausch WT-KIADR1 mit KIADR1-P118L über InFusion-Klonierung, Amplifizierung KIADR1-P118L mit XY292/XY293 an pJET::KIADR1'-P118L, Klonierung in mit *Cfr42I* und *Van91I* linearisiertes pXY86)
- pXY132 YCplac33::KIADR1-P108L**  
pXY102-Derivat; Ersetzen der DNA-Bindedomäne von *KIADR1* durch mutiertes Allel  
(über InFusion-Klonierung, Amplifizierung von KIADR1-P108L mit XY292/XY293 an pXY125, Klonierung in mit *Sall* und *Acc65I* linearisiertes pXY102)
- pXY133 YCplac33::KIADR1-P118L**  
pXY102-Derivat; Ersetzen der DNA-Bindedomäne von *KIADR1* durch mutiertes Allel  
(über InFusion-Klonierung, Amplifizierung von KIADR1-P118L mit XY292/XY293 an pXY126, Klonierung in mit *Sall* und *Acc65I* linearisiertes pXY102)
- pXY134 pTS32X::P<sub>KIFBP1</sub>(1000-1)-KIReb1Δ-GUS**  
pXY15-Derivat; Fusion des P<sub>KIFBP1</sub> (-1000 bis -1) mit *GUS*-Gen, wobei die potentielle *KIReb1*-Bindestelle (-770 bis -776) deletiert ist  
(PCR mit XY09/XY329 und XY328/XY14 an pXY20, Fusions-PCR an diesen PCR-Produkten mit XY09/XY14, Insertion über *Sall* und *SpeI* in pXY20)

Die in Klammern angegebenen Positionen der Sequenzbereiche beziehen sich auf die Lage zum jeweiligen Translationsstarts (+1 = ATG). Zur Klonierung der angegebenen Fragmente wurden Primer-vermittelt endständige Restriktionsschnittstellen angefügt. Amplifizierte PCR-Produkte wurden in mit *EcoRV* linearisiertes pJET1.2 zwischenkloniert, sequenziert und über die angefügten Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor kloniert. Entstandene Plasmide durch Zwischen-Klonierungsschritte sind in Klammern angegeben, aber nicht näher beschrieben.

**Tabelle A2: Oligonukleotide für Stammkonstruktion**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3')
<b>Deletion von <i>KIADR1</i></b>		
-	KIADR1-ORF_FW (K) (N)	AAAGGGTAAACCGAACCAGAG
-	KIADR1-ORF_RV (K)	CGTTTTGGTTGTCTTATTGCGG
XY19	KIADR1-Bam-FW (K)	GATCCTGCTCAGTTACAATC
XY20	KIADR1-Bam-RV2 (K) (S)	GGGTGGAAGCGCATGATGTAAAG
-	ScURA3-FW-Van91I (K)	ACCACTCCGTGGAAGAGTATTGAGAAGGGCAAC
-	ScURA3-RV-Van91I (K)	ACCACGGAGTGCCAAGATTCCCGGGTAATAACTGA
XY50	KIADR1-KO_RV2 (N)	TCGACGAGGATAATCTATGG
XY49	KIADR1-KO_FW2 (S)	ACGAACGGTCTCACACTAAG
<b>Deletion von <i>KIHAP4</i></b>		
-	ScURA3-FW-SexAI (K)	GACCAGGTAAGAGTATTGAGAAGGGCAAC
-	ScURA3-RV-EcoNI (K)	GCCTTGAAGAGGAAGATTCCCGGGTAATAACTGA
XY72	IF4-KIHAP4_FW (K)	GGCGCCATCTCCTTGCATGCGGGGATGTCAAGACCAGC
-	KIHAP4-ORF_FW (N)	GTCTGTAAGATTCCGCAAACG
-	KIHAP4-ORF_RV (N)	GAAACGAATCAGGCCTCAATG
XY21	KIHAP4_FW2 (S)	TCGTACCGTGAGCAATCAAC
XY46	KIHAP4_RV3 (K) (S)	TTAGCGGGGATAACATAATTGACA
<b>Deletion von <i>KIGAL4</i></b>		
XY259	IF-KanMX_F (K)	CTTACGGTTTCACGGACCGGACATGGAGGCCCAAGAATAC
XY260	IF-KanMX_R (K)	GTTTTCCGGATGGCTCGAGCAGTATAGCGACCAGCATTC
KL139	KIG4_IF_(-1119) (S)	TATAGGGCGAATTGGAGCTCAAGTCGGTTGTCTTCTCTC
VAK122	LAC9-1-P_rev_Ve (S)	CGGTCTGTTCCGGTCCGTGAAACCGTAAAGTCCTG
<b>(HA)<sub>3</sub>-Epitopmarkierung von <i>KIAdr1</i> (Nachweis und Sonde wie für Deletion)</b>		
XY32	IF3-KIADR1-R (K)	TATAGGGCGAATTGGAGCTCCGTTCTGTTAGAAGTCGATCAG
XY70	IF4-KIADR1_FW (K)	GGCGCCATCTCCTTGCATGCCTACCAGCAAGTGAC
XY184	IF1-HA-ADR1_RV (K)	GTACATTTTGGATCCGACAGAATATATATCTAGCCTTAAACTC
XY185	IF-HA_FW (K)	GGATCCAAAATGTACCCATACGATGTTCC
XY186	IF-HA_RV (K)	ACATTGAGCAGCGTAATCTGGAACGTCAT
XY187	IF3-HA-ADR1_FW (K)	TACGCTGCTCAATGTCAAGCTGCCTGTTCC

**PAR-Mutation**

XY275	KIADR1-P108L (K)	AATTTGATATGTTGCTCGATCATCTACGATT
XY276	KIADR1-P118L (K)	TGAACGGGGTGACTCTCAGTGGGAAGCCAAG
XY292	IF-PAR_F (K)	TGTTGATGCTGCCACGGAGTGGCAACGTTAGCGCGGTAC
XY293	IF-PAR_R (K)	CTGCTGCCGACTTGGCCGCGGCTTTTGCAGCAGCATCTG

**Deletion von ScSIP4**

-	KO-ScSIP4_F	AAAAAAAAAAGTATATAAGGCAGAAAGCTTTCTGCCTCTCCGA TTTCTCTCTACGGCCAGTGAATCCCCGG
-	KO-ScSIP4_R	TGCAAAGGTTTAGCTGGGTATTGACCTTAGACGCGAAATTC GACTTGACTAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG

Kennzeichnung der verwendeten Oligonukleotide: (K) Konstruktion, (N) Nachweis auf ortsspezifische Integration, (S) Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde für Southern.

**Tabelle A3: Oligonukleotide für Konstruktionen zur KIFBP1-Promotoranalyse**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3')
XY09	KIFBP-1000F-Sal	ATAGTCGACGAAAAGTACGTTACCAGACG
XY10	KIFBP-800F_Sal	ATAGTCGACATCTCAGTTACTTTTCACGA
XY11	KIFBP-600F_Sal	ATAGTCGACTATATGACCCCAGATTCATT
XY12	KIFBP-400F_Sal	ATAGTCGACCTCATTCTGTTTTTCTTTTG
XY13	KIFBP-200F_Sal	ATAGTCGACATATTGTCTGTTTGATCCTT
XY14	KIFBP-1R_Xma	ATACCCGGGTATTAATTATTTAATCGGG
XY23	GUS-Sal-Xma-FW	ATAGTCGACGTTGACCCGGGATGTTACGTCCTGTAGAAAC
XY24	GUS-Hind-RV	ATAAAGCTTCGCGCTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG
XY25	GUS-Spe-FW	ATAACTAGTCGCATGTTACGTCCTGTAGAAACCC
XY26	GUS-SacII-RV	ATACCGCGGTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCG
XY38	CYC1-Spe-R1	AACTAGTTATTAATTTAGTGTGTGTAT
XY39	KIFBP1-1-Nae_R	AGCCGGCTTATTAATTATTTAATCGGG
XY53	KIFBP1-800F-Xho	ACTCGAGATCTCAGTTACTTTTCACGA
XY55	KIFBP1-200R-Xho	ACTCGAGTACACGACTTACATCCATAC
XY56	KIFBP1-400R-Xho	ACTCGAGGAAAAGCTCGCTATGGAC
XY57	KIFBP1-600R-Xho	ACTCGAGATCGTGATGTGTGGGTT
XY328	KIFBP1-REB1d_F	CTTTTCACGAGATATATATCACGGTATTTAAATCTACTTG
XY329	KIFBP1-RBE1d_R	TAAATACCGTGATATATATCTCGTGAAAAGTAACTGAG

**Tabelle A4: Oligonukleotide für weitere Fusionskonstrukte**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3')
<b>Konstruktion von pKlICL1-GUS Varianten</b>		
XY193	Sal-pKlICL1_F	AGTCGACGGCCGAGTGGTTAAGGC
XY194	Spe-pKlICL1_R	AACTAGTTATGTTGGGTTTGTATGTTTTGTGCG
XY226	pKlICL1-Adr1-1d_R	CCTTACTTTAAGTAACAGATAATCACATAG
XY227	pKlICL1-Adr1-2d_F	ACATTTTCGCATGAAAAGTTGACTCAGTT

XY228	pKIICL1-Adr1-1d_F	CTATGTGATTATCTGTTACTTAAAGTAAGGTTTCACTTT
XY229	pKIICL1-Adr1-2d_R	AACTGAGTCAACTTTTTTCATGCGAAAATGTCCGT

**Konstruktion von pScFBP1-GUS**

XY224	pScFBP1-Sal_FW	AGTCGACGCCAAGGAAGGTGGGTTT
XY225	pScFBP1-Spe_RV	AACTAGTATGTGTGGTAGTATGAGGG

**Konstruktion zur Überexpression der KIADR1-Bindedomäne**

XY202	Asc-KIAdr1-BD_F	AGGCGCGCCATGAATATGACGGGACTTCGC
XY203	Not-KIAdr1-BD_R	TGCGGCCGCCTATACCGATGAGGAAACATCAC
XY204	Spe-pADR1_FW	AACTAGTCTTACCAAACGTTTTTCAGATTC
XY205	Sgs-pADR1_RV	AGGCGCGCCGACAGAATATATATCTAGCCTTAAAC

**Konstruktion des GBD-SIP4-Fusionskonstrukts**

XY242	IF-BD-Gal4_F	TACGCTGCTCAATGTATGAAGCTACTGTCTTCTATCG
XY246	IF-T-MET17_F	ATAATCAAGGAGTAGGTCGACGTGTGCGTAATGAGTTGTAATAAT
XY247	IF-T-MET17_R	TATAGGGCGAATTGGAGCTCGTATGGAAAGTAGCATCCAACC
XY263	IF-BD-Gal4_R2	TATAGGGCGAATTGGAGCTCCGATACAGTCAACTGTCTTTGAC
XY264	IF-KISIP4_F2	AGTTGACTGTATCGGAGCTCGTCGACAGTGATAAGCTTACAAGACG
XY265	IF-KISIP4_R1N	ACGTCGACCTACTCCTTGATTATGATGTGGTC
XY266	IF-T-MET17_F2	GGAGTAGGTCGACGTGTGCGTAATGAGTTGTAATAAT
XY267	IF-T-MET17_R2	TATAGGGCGAATTGGAGCTCGTATGGAAAGTAGCATCCAACC

**Tabelle A5: Oligonukleotide für quantitative PCR**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3') FW-Primer	Sequenz (5' - 3') RV-Primer
<b>Amplifizierung von ORF-Sequenzen</b>			
AJ33 + AJ34	K.ALG9-RT-	ATACTGCGAGGGCGTTATTG	ACACTGGCATGAAACCATCC
AJ39 + AJ40	KI.TRR1-	CAGGAATACCGTGCTCCAG	ATCGGAGACGTGGCAATTAC
AJ47 + AJ48	KI.FOX2-	ACGAAAGCCCGTGAATTACC	TGGCACCGTATCTAGCAAAC
AJ49 + AJ50	KI.ICL1-	TGTTCTTCGACTGGGACTTG	CCTTCAGCGAATTCCTTAGC
AJ81 + AJ82	KI.IPP1-RT-	TAAGGCTGTTGGTGACAACG	ATCGATGGCAATGACCTTCC
AJ139 + AJ140	KI.FBP1-RT-	GATTGGCTGGTGCTTCAAAT	GCACCGTACATAGTGTAACA
AJ165 + AJ166	KI.PCK1-RT-	TCACAATGTCCTCACCTTAC	TCACCGATCAACAGTCTATG
AJ195 + AJ196	KI.FAA2-RT-	CTTACAGCAATCTCGTTGTC	CTCCCATGATAGTTGGTTTC
AJ199 + AJ200	KI.POT1-RT-	GTGGCTATTAACAGACAGTG	TCGGACCATAGTTCTTAGAC
AJ205 + AJ206	KI.YAT1-RT-	AACTGGTACCTTGCTACTG	GTTCAAAGAAGGTGGCAATC
AJ227 + AJ228	KI.CRC1-RT-	GGATGCTGCCAAACAGATAG	GGCAAAGTATAACGCACTTC
AJ249 + AJ250	KI.C17237g-RT-	CAAGACACAACCATCCGTTA	AAACAGTAGCCACTTCATCG
AJ251 + Aj252	KI.MLS1-RT-	CGGTCAAGTGAACCTGTATG	AGCCTCTTGGTCTAACAATC
AJ253 +AJ254	KI.NTR2-RT-	TGAAGTTGCTCAGCAATCAG	TCGTCTTGCAAGTGTATC
AJ257 +AJ258	KI.YAT2-RT-	GATGTGCTACCAAGAAATCC	TCAAGGCACTGACAAATCTC
AJ285 + AJ286	KI.PEX21-RT2-	GCCCAATCCATTTACACAAC	CACCATCGCTGATATTTCTC
AJ299 +AJ300	KI.CAT2-RT-	AACTGGATGCAAGAACTATG	AGTTGGTAAAGGCTTATGAC
AJ501 +AJ502	KI.CIT2-RT-	AGGCTTTGTCAGCAGATTTG	GTAAGTCCATCGAGAATTG

AJ503 + AJ504	KI.ACO1-RT-	CCCAGGTGCTTTGATTATTG	CATGACATCGACAGCATCAG
AJ507 + AJ508	KI.MDH3-RT-	TTCTGGTGAGACCATCATTC	CAACTTCATCACCACCAAAC
AJ511 + AJ512	KI.ACS1-RT-	CAAGCGTATCGTCGATGAAG	CCAAATCCCTACCTGGAATG
AJ513 + AJ514	KI.ACS2-RT-	AGATTGTCGACGAAGGTTTG	ATCTCTAGCTGGCTTCATTG
AJ557 + AJ558	KIGUT2-RT	ACTGGTTTGCCAGACGATTC	AATATGGACACCGGCACTTG
AJ559 + AJ560	KIGUT1-RT	GGGATGGGTCAATGTAAAC	ATAAGGCGGTAGACCATTAG
XY135 + XY136	KIIDH1-RT_	AGGTGATGGTGTGGTAAGG	AATGAGCCATGACCGGTTTG
XY137 + XY138	KICIT3-RT_	TACCACCTCACACGGAGAAG	GGCCTAAAGGTTACCATCG
XY139 + XY140	KIENO1-RT_	GGGTGCTAACGCTATCTTGG	GGAAGTGGCAAGACGAATGG
XY208 + XY209	KIHIS3-RT_	AGGAATCCGATGCTGCTAAG	AATCCTCGGTGGTATGATGG
XY278 + XY279	KICDC25-RT_	GGTCACGGAGGAACAGTTTG	TCGTGGAAAGTAGTCGTACC
XY284 + XY285	KICDC46-RT_	TTGGCAGGTGAAGAACTGTC	TGCTCCGTATTACGTCAAG
XY296 + XY297	KIMPA43-RT_	TCTCCCGTAAGTGTCTTGC	ACTCCTTGAGCGAGAGTTC
XY298 + XY299	KIRAD50-RT_	GGGCGTACCGAAGGCTATC	TTGGTCGCGGTAGACCTATC
CM309 + CM310	Sc.ICL1-RT-	AACTAGAGGCACGGTCAAAG	CACCACGCTCAATGAACATC
CM343 + CM344	Sc.IPP1-RT-	GACCGATTGGAAAGTTATTG	TCTGAACCATTCTGTTAGTAG
<b>Amplifizierung von Promotor-Sequenzen (ChIP)</b>			
-	KI.ICL1-CSRE-	AAGGACGAATGACACAAGAC	TAACCTGCTATTTGGCTGAG
-	KI.MLS1-CSRE-	CGTTACCCGAATACAAAGAC	AAACTCACGCAATCAGTATG
-	KI.CIT2-CSRE-	TCGTTAGTAGTGGTGATAGG	AGAGTTGCGTGGGATCTATG
XY198 + XY199	KIICL1-Adr1-1_	CCGTAAGCTCACCTAATCTG	AGCGTTCTGTGTCTTGTGTC
XY200 + XY201	KIICL1-Adr1-2_	CCGCCATTAACCGAATGTG	TGCTATTTGGCTGAGGAACC

**Tabelle A6: Oligonukleotide für Nachweis und Sequenzierung bei Plasmidkonstruktion sowie für Northern Blot-Analysen**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3')
-	pJET_FW	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
-	pJET_RV	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
-	M13_FW	GTAAAACGACGGCCAGT
-	M13_RV	CAGGAAACAGCTATGAC
-	CEN2	ATTGAATAGCCAAAGTGA
V1	ScURA1	TCTGTGCTCCTTCCTTCGTT
V10	KEp6-tet_up	ATCGGTGATGTCGGCG
V11	KEp6-tet_down	TCCGACCGCTTTGGC
K84	KLMRPL13left	ACTGTCGACGCAATAACGGGTCAATTTTCG
XY178	KIFBP1-Sonde_FW	CAAATAGTACCGGTGACCAG
XY179	KIFBP1-Sonde_RV	CGTCTCCAGAGCTACCTAAC

**Tabelle A7: Oligonukleotide für *Pulldown* und EMSA-Analyse**

Kürzel	Name	Sequenz (5' - 3')	Modifizierung
XY312	BIO-KIFBP1-800_F	GATCTCAGTTACTTTTCACGAG	5'-Biotin
XY313	KIFBP1-600_R	ATCGTGATGTGTGGGTTTC	-
XY330	BIO-Reb1-FBP1_F	GAGATATCCGGGTAATATCAC	5'-Biotin
XY331	Reb1-FBP1_F	GAGATATCCGGGTAATATCAC	-
XY332	Reb1-FBP1_R	GTGATATTACCCGGATATCTC	-
XY333	BIO-Reb1-HML_F	CGTATGTCCGGGTAATAATA	5'-Biotin
XY335	Reb1-HML_R	TATTATTTACCCGGACATACG	-
XY336	BIO-CSRE-LAC4_F	TAAGTCGGATGAAAGGGGAATC	5'-Biotin
XY337	CSRE-LAC4_R	GATCCCCTTTTCATCCGACTTA	-
XY338	BIO-Reb1-FBPm_F	GAGATATCCGGtgATATCACG	5'-Biotin
XY339	Reb1-FBPm_R	CGTGATATcaCCGGATATCTC	-

**Tabelle A8: Verwendete Chemikalien und Enzyme**

Chemikalie / Enzym	Hersteller
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	Roth
Adenin	AppliChem
Agar-Agar	Roth
Agarose	Serva
Aminosäuren	AppliChem
Ammoniumacetat (NH <sub>4</sub> Ac)	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	AppliChem
Borsäure	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Riedel-de Haën
Chloramphenicol	Serva
Chloroform	Roth
Coomassie R250	Serva
Deoxycholat (Natrium-)	Sigma
DL-Isocitrat	Sigma
DNaseI	Ambion
DTT	Thermo Fisher
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (vergällt)	Roth
Ethanol (unvergällt, als C-Quelle)	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ficoll 400	AppliChem
FOA	ForMedium



Formaldehyd (methanolfrei)	Roth
Formamid	Serva
Formamid, deionisiert	Roth
D(+)-Glukose	Roth
Glycerol	Serva
Glycerophosphat	Sigma
Glycin	AppliChem
Glycogen	Thermo Fisher
HCl	Roth
Hefeextrakt	BD Difco
HEPES	Roth
IPTG	Formedium
Isopropanol	AppliChem
Kaliumacetat	Roth
Kanamycin	AppliChem
KCl	Roth
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
L-Cystein-HCl	Fluka
Lithiumacetat (LiAc)	Sigma
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth
Maleinsäure	Merck
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Magnesiumacetat (MgAc)	Roth
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Roth
Milchpulver	Roth
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Roth
MOPS	Roth
Di-Natrimhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
NAD	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nitroblautetrazoliumchlorid	Diagnostic Chemicals
N-Laurylsarkosin (35%)	Serva
Nonidet P-40	Roche
ONPG	AppliChem

---

Orange G	Roth
PBS	Sigma
PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) (25:24:1)	Roth
PEG4000	Roth
PEG8000	Roth
Pepton	Roth
Phenazinmethasulfat	Sigma
Phenylhydrazin-HCl	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
PNPG	Sigma
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Rubidiumchlorid (RbCl)	AppliChem
RNaseA	Qiagen
Saccharose	Roth
<i>Salmon Sperm</i> DNA	Sigma
SDS	Roth
Sorbitol	Roth
TEMED	Roth
Trinatriumcitrat	Roth
Tris	AppliChem
Triton X-100	AppliChem
Trypton	Serva
Tween 20	Roth
Uracil	AppliChem
X-Phosphat-Lösung (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	BioVectra
YNB ( <i>yeast nitrogen base</i> )	BD Difco
Zymolyase 100T	Amsbio

---

**Tabelle A9: Relative Genexpression im Wildtyp (Glycerol bzw. Ethanol vs. Glukose)**

Eine Auflistung aller relativen Expressionswerte vom Wildtyp JA6 zwischen Glycerol und Glukose bzw. Ethanol und Glukose befindet sich in der Excel-Datei „Tabelle A9“ auf der beigelegten CD. Herunter regulierte Gene sind grün und hoch regulierte Gene sind rot markiert.

**Tabelle A10: Relative Genexpression in *Kladr1*Δ vs. Wildtyp (Glycerol und Ethanol)**

Eine Auflistung aller relativen Expressionswerte zwischen *Kladr1*Δ und dem Wildtyp (JA6) in Glycerol sowie in Ethanol befindet sich in der Excel-Datei „Tabelle A10“ auf der beigelegten CD. Herunter regulierte Gene sind grün und hoch regulierte Gene sind rot markiert.

**Tabelle A11: Genombereich isolierter Suppressorplasmide**

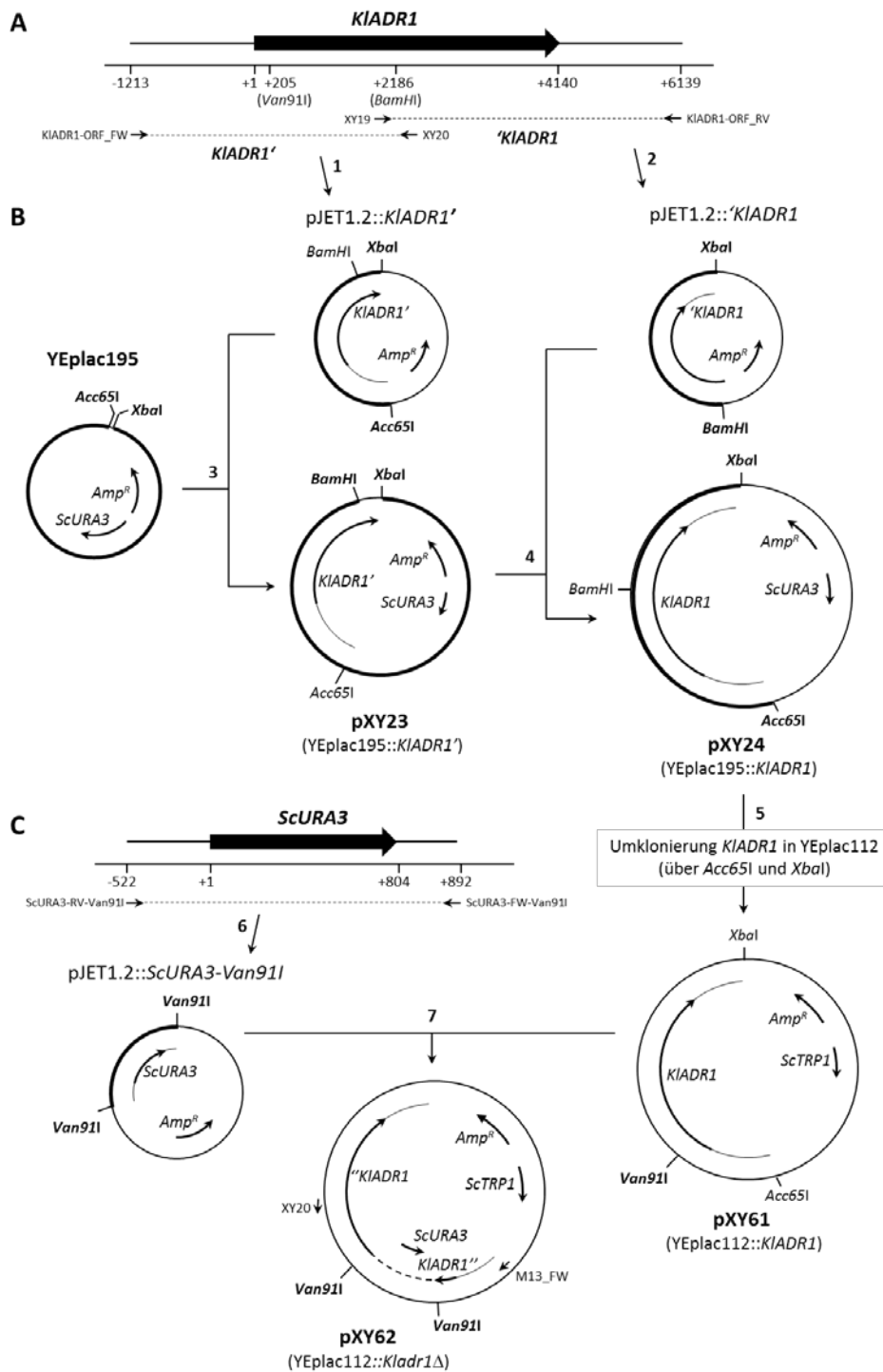
Plasmid	Chr.	Genomfragment (bp)	insetierte ORFs
pKE01	D	1.492.319 - 1.498.973	rDNA cluster, KLLA0D17952g (hypothetical)
pKE07	A	1.010.070 - 1.020.578	KLLA0A11770g ( <i>HIP1</i> )
pKE11	D	775.435 - 780.608	KLLA0D09240g ( <i>GAC1</i> )
pKE12	A	1.013.488 - 1.018.068	KLLA0A11704g ( <i>FRP1</i> ), KLLA0A11748g (hypothetical), KLLA0A11770g ( <i>HIP1</i> ), KLLA0A11792g (conserved hypothetical)
pKE25	C	256.455 - 268.456	KLLA0C02849g ( <i>TEX1</i> ), KLLA0C02871g ( <i>MPRL17</i> ), KLLA0C02893g ( <i>NRD1</i> ), KLLA0C02915g ( <i>RAD50</i> ), KLLA0C02937g ( <i>MPA43</i> ), KLLA0C02959g ( <i>RPA49</i> ), KLLA0C02981g ( <i>JJJ3</i> ), KLLA0C03003g (hypothetical ORF YJR098C)
pKE46	C	257.088 - 266.916	KLLA0C02871g ( <i>MRPL17</i> ), KLLA0C02893g ( <i>NRD1</i> ), KLLA0C02915g ( <i>RAD50</i> ) und KLLA0C02937g ( <i>MPA43</i> )
pKE99	D	774.550 - 785.717	KLLA0D09240g ( <i>GAC1</i> ), KLLA0D09284g ( <i>SMD2</i> ), KLLA0D09262g ( <i>CDC46</i> ), KLLA0D09306g ( <i>CDC25</i> ) (partiell)
pKE123	D	780.083 - 788.623	KLLA0D09262g ( <i>CDC46</i> ), KLLA0D09306g ( <i>CDC25</i> )
pKE150	D	1.495.098 - 1.502.426	rDNA cluster
pKE169	D	1.501.915 - 1.506.714	rDNA cluster
pKE197	D	1.499.415 - 1.504.179	rDNA cluster

**Tabelle A12: Adr1-abhängige Gene in *K. lactis* und *S. cerevisiae***

Eine Auflistung aller Adr1-abhängigen Gene in *K. lactis* und in *S. cerevisiae* im direkten Vergleich befindet sich in der Excel-Datei „Tabelle A12“ auf der beigelegten CD.

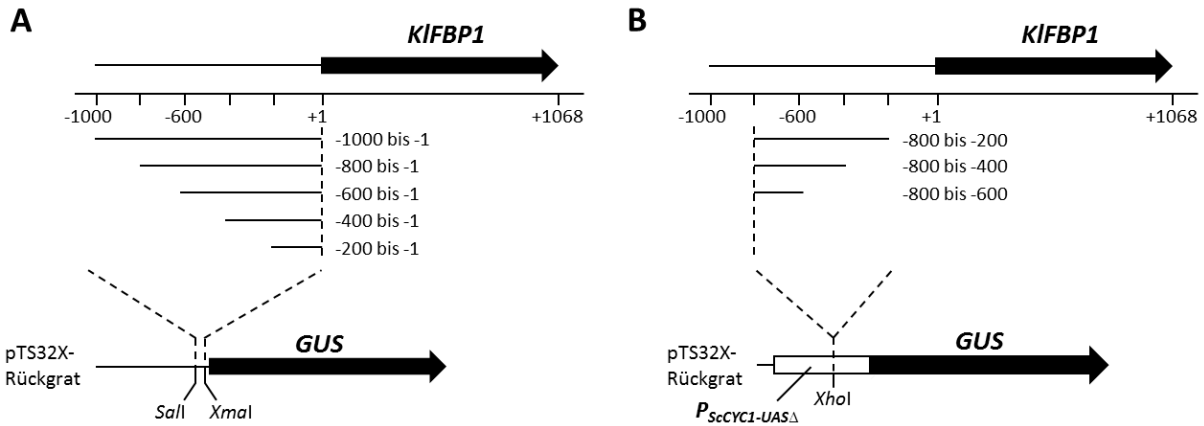
**Tabelle A13: Zuordnung der *Microarray*-Daten**

Dateiname	Beschreibung
1_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Glukose (Replik 1)
2_240616_2.CEL	Wildtyp (JA6) in Glukose (Replik 2)
3_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Glycerol (Replik 1)
4_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Glycerol (Replik 2)
5_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Glycerol (Replik 3)
6_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Ethanol (Replik 1)
7_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Ethanol (Replik 2)
8_240616.CEL	Wildtyp (JA6) in Ethanol (Replik 3)
9_280616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Glycerol (Replik 1)
10_280616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Glycerol (Replik 2)
11_280616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Glycerol (Replik 3)
12_280616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Ethanol (Replik 1)
13_170616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Ethanol (Replik 2)
14_170616.CEL	<i>adr1::ScURA3</i> (KSY13) in Ethanol (Replik 3)



**Abbildung A1: Klonierung *KIADR1*-Deletionsplasmid.**

Schematischer Ablauf der Klonierung eines Plasmids zur Deletion von *KIADR1*. **A.** Der *KIADR1*-Lokus wurde in zwei Fragmente unterteilt, die sich an einer *Bam*HI-Schnittstelle überschneiden. **B.** Die Fragmente wurden mit den angegebenen Primern amplifiziert und in pJET1.2 subkloniert (1, 2). *KIADR1'* wurde über *Xba*I und *Acc651* in YEplac195 eingefügt (=pXY23; 3). Die Vervollständigung des ORFs erfolgte über Klonierung von 'KIADR1 über *Xba*I und *Bam*HI in pXY23 (=pXY24; 4). **C.** Zur Disruption des ORFs mit einer *ScURA3*-Kassette wurde der *KIADR1*-Lokus in einen Vektor mit einem *ScTRP1*-Marker umkloniert (=pXY61; 5). Der *ScURA3*-Lokus wurde mit endständigen *Van91I*-Schnittstellen und den angegebenen Primern amplifiziert und in pJET1.2 subkloniert (6). Diese *ScURA3*-Kassette wurde über *Van91I* in pXY61 inseriert und der ORF von *KIADR1* zerstört (=pXY62; 7). Klonierungsfragmente und verwendete Restriktionsenzyme der einzelnen Schritte sind dick hervorgehoben.



**Abbildung A2: Klonierung verschiedener  $P_{KIFBP1}$ -Konstrukte.**

Schematische Darstellung der Klonierung verschiedener Deletionsvarianten des  $KIFBP1$ -Promotors.

**A.** Zur Verkürzung des 5'-Endes des Promotors wurden die angegebenen Bereiche über *Sall* und *XmaI* direkt vor den ORF des *GUS*-Gens kloniert. **B.** Zur Verkürzung des 3'-Endes des Promotors wurden die angegebenen Bereiche über *XhoI* in die *XhoI*-Schnittstelle des *ScCYC1-UASΔ*-Promotors *upstream* des *GUS*-Gens kloniert. Die Orientierung der Insertionen wurde über PCR und Restriktionsanalyse überprüft.

Species	Accession	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>A. nidulans</i> (amdX)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>N. crassa</i> (NCU09496)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. pombe</i> (rst2)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. albicans</i> (C4_02500C)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kudriavzevi</i> (Skud_4_478)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. cerevisiae</i> (Adr1)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. mikatae</i> (Smik_4_463)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. glabrata</i> (CAGL0E04884g)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. gossypii</i> (AGR172W)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kluyveri</i> (SAKLOH12958g)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. waltii</i> (Kwal_47.17927)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. lactis</i> (KLLA0F13068g)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>TAD1</b>											
<i>A. nidulans</i> (amdX)	17	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>N. crassa</i> (NCU09496)	26	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. pombe</i> (rst2)	43	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. albicans</i> (C4_02500C)	68	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kudriavzevi</i> (Skud_4_478)	67	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. cerevisiae</i> (Adr1)	67	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. mikatae</i> (Smik_4_463)	73	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. glabrata</i> (CAGL0E04884g)	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. gossypii</i> (AGR172W)	12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kluyveri</i> (SAKLOH12958g)	22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. waltii</i> (Kwal_47.17927)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. lactis</i> (KLLA0F13068g)	88	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>DBD</b>											
<i>A. nidulans</i> (amdX)	102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>N. crassa</i> (NCU09496)	109	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. pombe</i> (rst2)	121	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. albicans</i> (C4_02500C)	161	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kudriavzevi</i> (Skud_4_478)	148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. cerevisiae</i> (Adr1)	148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. mikatae</i> (Smik_4_463)	154	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. glabrata</i> (CAGL0E04884g)	84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. gossypii</i> (AGR172W)	93	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kluyveri</i> (SAKLOH12958g)	103	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. waltii</i> (Kwal_47.17927)	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. lactis</i> (KLLA0F13068g)	169	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. nidulans</i> (amdX)	150	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>N. crassa</i> (NCU09496)	160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. pombe</i> (rst2)	190	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. albicans</i> (C4_02500C)	256	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kudriavzevi</i> (Skud_4_478)	193	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. cerevisiae</i> (Adr1)	193	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. mikatae</i> (Smik_4_463)	199	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. glabrata</i> (CAGL0E04884g)	137	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. gossypii</i> (AGR172W)	122	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>S. kluyveri</i> (SAKLOH12958g)	169	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. waltii</i> (Kwal_47.17927)	22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>K. lactis</i> (KLLA0F13068g)	269	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....





Anhang

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
A.nidulans (amdX)	552	.....LNLSSTGVVGGGCLHLSMAATGALVYLDLT	.....AASRDLEPARRMIOQLYLEBRKADMTAVSRSSKFG	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DNS
N.crassa (NCU09496)	568	.....QDNGIGGGSCILLSMAATGALVYEMEQ	.....QISMGLFCARRMIOQLYDEBRKANVRKADFRFRSPMSDHTLQQQEN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.albicans (C4_02500C)	723	.....TGMEDINNESAFVCLPLFLATGALVANNK	.....NDAEFLYEFSRRHLEFVLESEKTNSTNDNRN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....YKNGKRS
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	687	.....DRLSQGTDRKYD--YEHYRILSISFVCLPLEMATFGSLRFGY	.....RSCDHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N
S.cerevisiae (Adrl)	686	.....DRLSQGTDRKYD--YEHYQILSISFVCLPLEMATFGSLRFGY	.....RSCDHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N
S.mikatae (Smik_4.463)	687	.....DRLSQGTDRKYD--YEHYQILSISFVCLPLEMATFGSLRFGY	.....RSCDHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N
C.glabrata (CAGL0E04884g)	797	.....NIDFDGSTNVHDIPIGSRMQAGIASIVCLPLFLMATGSGSYRNDN	.....NEFMELYLEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SLIMKRRMQ
A.gossypii (AGR172W)	439	.....DSHVQCSNVCLPLFLMATGSGSYRNDN	.....NEFMELYLEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	545	.....DEMMSFNVCLPLFLMATGSGSYRNDN	.....RTEHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....V
K.waltii (Kwal_47.17927)	424	.....DEVFINSNVCLPLFLMATGSGSYRNDN	.....RTQHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....RS
K.lactis (KLLA0F13068g)	762	.....DMLYHNNVCLPLFLMATGSGSYRNDN	.....STSEHELYEFSRVLLEFLETRRLCRSTAV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....S

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
A.nidulans (amdX)	623	.....VHNTLWLVQAMLVVYGHGTCGDKTS	.....ADIASTHCAALVSLAAAEALFRHIDAKDLQDYLAHAGFAGKSDP	.....QGGDLVDSWSQF	.....GAP	.....KERKD	.....	.....	.....	.....
N.crassa (NCU09496)	641	.....PVVETFWLVQAMLVVYGHGTCGDKRS	.....GELASTHAAALVSLAAAGAEALNPIRIPESV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N-AAEVE
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.albicans (C4_02500C)	792	.....SSGNFLWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....VYVIRGLNALSLVTRTSIRN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....KGPIFFSN
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	760	.....DNHGNWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDSSIMKRCLSALCSPTRSNCLP	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....TISA-N
S.cerevisiae (Adrl)	759	.....DSYQNWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDSSIMKRCLSALCSPTRSNCLP	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....TISA-N
S.mikatae (Smik_4.463)	760	.....DCHGNWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDSSIMKRCLSALCSPTRSNCLP	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....TISA-N
C.glabrata (CAGL0E04884g)	886	.....NQQHEWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDTQVVRGVAAGCSHRSNLLA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DITY-S
A.gossypii (AGR172W)	501	.....PTGNLWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDTQVVRGVAAGCSHRSNLLA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DITY-S
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	605	.....GCSGNLWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDTQVVRGVAAGCSHRSNLLA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DITY-S
K.waltii (Kwal_47.17927)	485	.....KSRGSLWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDTQVVRGVAAGCSHRSNLLA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DITY-S
K.lactis (KLLA0F13068g)	825	.....PLNSNLWLVQSLVLYLGSFSDNENN	.....IDTQVVRGVAAGCSHRSNLLA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DITY-S

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
A.nidulans (amdX)	716	.....WLDWFLVRRRFLFAFAASCLVSAHAPATNSERF	.....LDLPCEDVWFAESQAWKQM	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GGHLSKKN-VAFSSALLTLTAGRRVQ
N.crassa (NCU09496)	715	.....WLEWKSMEERRRFLVYVLLSSLVVSAHAPATNSERF	.....LDLPCEDVWFAESQAWKQM	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GGVAAANNRMTFHEALGALLQRQ-KVA
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.albicans (C4_02500C)	878	.....YKRNINMCSQTRIVFVILVRLTFLMVMVPLTFSTNDINQLAVTSRDEPILV	.....NFRNYQEFQEFSHKNNKTLDDYLNHNKNEPIIFRELLLVKIFGISDS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	831	.....SLOYIIFESKRIRCTLMVDRCCQFLRQEFHFKPELSKGNVDSIVFPDNEPWSSESLISGRH	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
S.cerevisiae (Adrl)	830	.....PLOYIIFESKRIRCTLMVDRCCQFLRQEFHFKPELSKGNVDSIVFPDNEPWSSESLISGRH	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
S.mikatae (Smik_4.463)	831	.....SLOYIIFESKRIRCTLMVDRCCQFLRQEFHFKPELSKGNVDSIVFPDNEPWSSESLISGRH	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.glabrata (CAGL0E04884g)	950	.....SEFYLYEIRIRVILMVKYCSQLFLVYVNDKTSYDFEIVTEALITEDDEYRQWQRLFDQNSPIDANVPMTSVSHSADKSAIN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LNQGSKKS
A.gossypii (AGR172W)	567	.....PANYLYEIRIRVILMVKYCSQLFLVYVNDKTSYDFEIVTEALITEDDEYRQWQRLFDQNSPIDANVPMTSVSHSADKSAIN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LNQGSKKS
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	666	.....QAQYIFVESRIRTSIMMVKYCSQLFLVYVNDKTSYDFEIVTEALITEDDEYRQWQRLFDQNSPIDANVPMTSVSHSADKSAIN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LNQGSKKS
K.waltii (Kwal_47.17927)	546	.....STRYLVESEAIRVILMVKYCSQLFLVYVNDKTSYDFEIVTEALITEDDEYRQWQRLFDQNSPIDANVPMTSVSHSADKSAIN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LNQGSKKS
K.lactis (KLLA0F13068g)	888	.....BAETIIFESKRIRCTLMVDRCCQFLRQEFHFKPELSKGNVDSIVFPDNEPWSSESLISGRH	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LNQGSKKS

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
A.nidulans (amdX)	803	.....NSAALSDDSDKSDLR	.....PSSFGCFV-LINAL	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....HNYMETQRH
N.crassa (NCU09496)	802	.....SRLADGNDFTTNLPK	.....PSTFEGCLI-LINAL	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....HNYMETQRH
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.albicans (C4_02500C)	978	.....NI	.....SPEIRKRVTHQLQNLCKRYFCNCLVHCIVYERQVQEMKEVDTFRVLVYTKF	.....YPTNDGLGFCNFRPLA-NKLE	.....	.....	.....	.....	.....	.....KIDYA
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	893	.....TVGRQNFYDRNF-VASFTYG	.....HUESIPESLGS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SMIYVEYDLRK
S.cerevisiae (Adrl)	892	.....VVGRCNFYDRNF-VASFTYG	.....HUESIPESLGS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SMIYVEYDLRK
S.mikatae (Smik_4.463)	893	.....GVGRQNFYDRNF-VASFTYG	.....HUESIPESLGS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SMIYVEYDLRK
C.glabrata (CAGL0E04884g)	1042	.....LLELQSGGKRYQCHTVSKCF-YDIFPSTSGPSTPELAR	.....TMYVEFNSSQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SGEHLFTRIDTRRLELN
A.gossypii (AGR172W)	632	.....LLASTORVMQRNHTLFCRF-YDIFPSTSGPSTPELAR	.....TMYVEFNSSQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SGEHLFTRIDTRRLELN
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	730	.....KROKVTNQRNF-VASFTYG	.....HUESIPESLGS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SMIYVEYDLRK
K.waltii (Kwal_47.17927)	610	.....SROFTTNERF-VASFTYG	.....HUESIPESLGS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SMIYVEYDLRK
K.lactis (KLLA0F13068g)	952	.....KSEHLYHLNLFVFCSPFENDLGMETLHQVLVN	.....SLFVEYSTRKLSG	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....SNMVFHNRIDTRRLELN

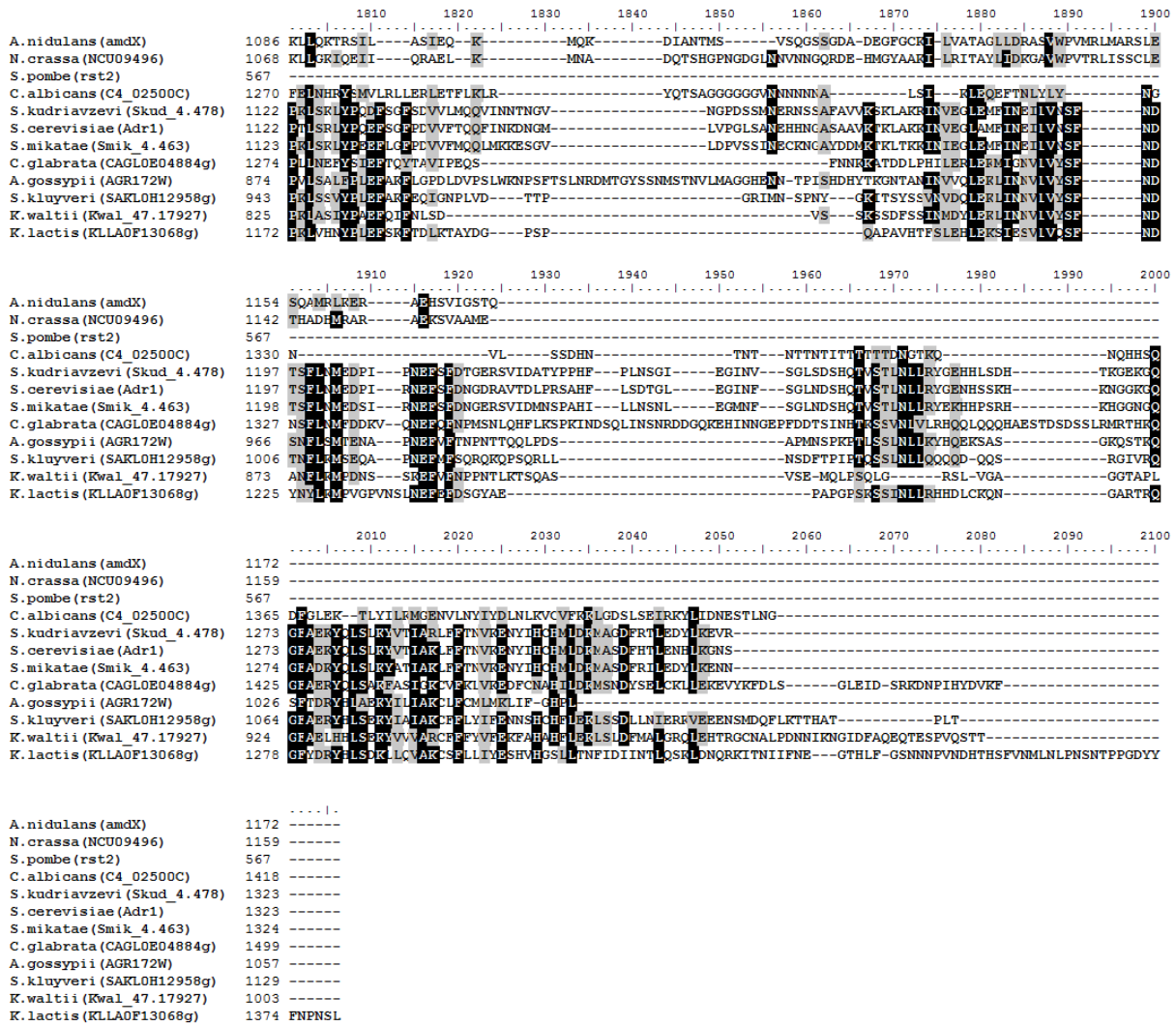
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
A.nidulans (amdX)	878	.....SLERPFPYAGPLSADSIPLLDLAVVRLVLDLGRCEAFWR	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DWNA-MADELARGTDVENVLDGIPSEVDPSS
N.crassa (NCU09496)	877	.....SPERPFPYAGPLSADSIPLLDLAVVRLVYVNFVSRVREKFWOR	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DWDG-MAEELARGSEIVQHAETPLAINLAP
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....ED
C.albicans (C4_02500C)	1056	.....LLVDFPKRISLILDLKLLREOSVLRN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....YQDLTONYHRL
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	963	.....NVGTTSPISLILDLKLLREOSVLRN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....YQDLTONYHRL
S.cerevisiae (Adrl)	962	.....NMAATNKNIAILL	.....DDIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
S.mikatae (Smik_4.463)	963	.....SMATANKNIAILL	.....DDIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
C.glabrata (CAGL0E04884g)	1122	.....EQMAFSGYKAKILL	.....DDIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
A.gossypii (AGR172W)	717	.....SLPGENSVTPLFNDFVCKLS	.....DSIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	801	.....DSDHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
K.waltii (Kwal_47.17927)	683	.....PISSVLL	.....DSIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF
K.lactis (KLLA0F13068g)	1024	.....ATSDCLI	.....DSIHLRNNLMSRFRQDDRSFPERVRKG-QIARIY	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DSFLSRRLNFRNYSVEVLCEFF

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
A.nidulans (amdX)	954	.....ALSMDDARRDSIASLVGELAI	.....SQTSPSQHEMPOQLLGA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....YRPGQTKREKL
N.crassa (NCU09496)	951	.....A-NTARPEAFSNLNLQOSP	.....LAIT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....NRRSDPRRERH
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LRRKAGIAADSLLNADKFNVTADATAR
C.albicans (C4_02500C)	1117	.....CISVLKLV	.....IFKVEDSNNSNRNSKNDPTNEINNNKLNNNNNNNNDMNNNSNGDQLISAFD	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DFYGLMDDNNGYAKKEEFSRFTDDELRY
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	1036	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
S.cerevisiae (Adrl)	1035	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
S.mikatae (Smik_4.463)	1036	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
C.glabrata (CAGL0E04884g)	1196	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
A.gossypii (AGR172W)	800	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	868	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
K.waltii (Kwal_47.17927)	750	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL
K.lactis (KLLA0F13068g)	1092	.....LVALNFSIRNISALYEEGSSD-ARQ	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GLLEBEPFYL

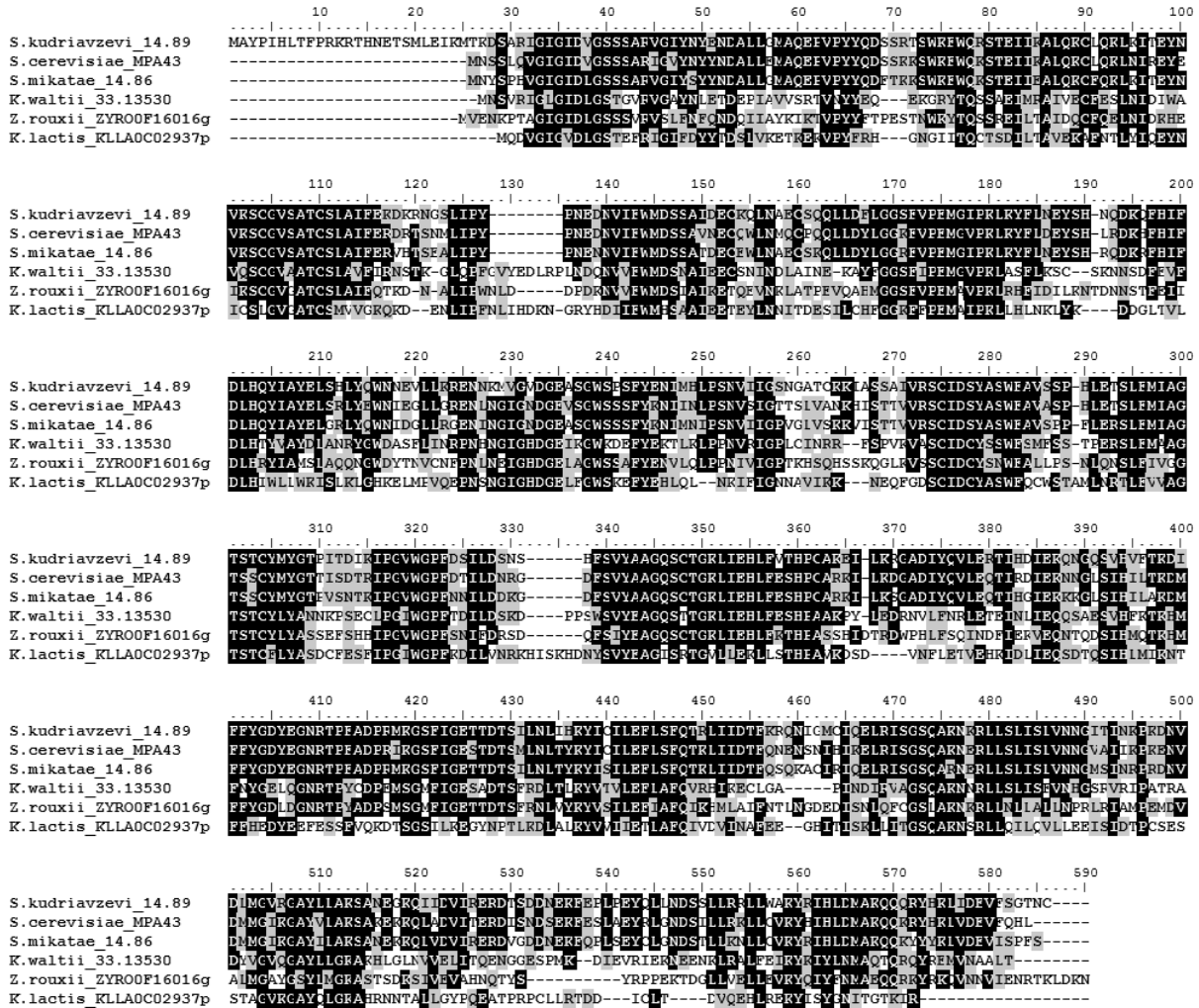
	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
A.nidulans (amdX)	1030	.....EPLQSAMCTFDCAVLAEWVATLQDRVGRYLGILGRDVLKEVAVVLLLED	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DC
N.crassa (NCU09496)	1012	.....EPLQSAMCTFDCAVLAEWVATLQDRVGRYLGILGRDVLKEVAVVLLLED	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....DI
S.pombe (rst2)	567	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C.albicans (C4_02500C)	1209	.....N	.....TMSVDEKH	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....IRLDFEVEKSSNLIQAMQLPHAFSVLSIFSVYVMRKNDNNSPFANDL
S.kudriavzevi (Skud_4.478)	1074	.....ALSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
S.cerevisiae (Adrl)	1074	.....ALSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
S.mikatae (Smik_4.463)	1075	.....ALSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
C.glabrata (CAGL0E04884g)	1226	.....KFSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
A.gossypii (AGR172W)	826	.....RVSVALMHQYVRIIVIVREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
S.kluyveri (SAKLOH12958g)	895	.....KFSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
K.waltii (Kwal_47.17927)	777	.....RVSVALMHQYVRIIVIVREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL
K.lactis (KLLA0F13068g)	1124	.....KFSVFNLCQGYVYFIIITRREI	.....LDFEATENFRLLIFHEIERSLANST	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....LL



**Abbildung A3: Sequenzvergleich von Adr1 in verschiedenen Ascomycota-Spezies.**

Sequenzvergleich der Adr1-Proteinsequenz *A. nidulans* AmdX ([www.aspergillusgenome.org](http://www.aspergillusgenome.org)), *N. crassa* NCU09496 (GB XP\_957856.2), *S. pombe* rst2 ([www.pombase.org](http://www.pombase.org)), *C. albicans* C4\_02500C (GB XP\_720502.2), *S. kudriavzevi* Skud\_4.478 (YGOB), *S. cerevisiae* Adr1 (GB NP\_010502.3), *S. mikatae* Smik\_4.463 (YGOB), *C. glabrata* CAGL0E04884g (GB XP\_445900.1), *A. gossypii* AGR172W (GB NP\_986838.2), *S. kluyveri* SAKL0H12958g (no), *K. waltii* Kwal\_47.17927 (YGOB) und *K. lactis* KALLAOF13046p (GB CAG98375). Schwarze Boxen markieren identische und graue Boxen Aminosäuren, die nicht identisch sind, aber ähnliche Eigenschaften besitzen. DBD = DNA-Bindedomäne, TADI-IV = Transkriptionsaktivierungsdomäne I bis IV. Die Sequenzen stammen von den angegebenen Quellen (GB = Genbank; YGOB = Yeast Genome Order Browser, <http://ygob.ucd.ie/>). Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt und mit BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) bearbeitet. Das Bild „Abbildung A3“ befindet sich in digitaler Form auf der beigelegten CD.





**Abbildung A4: Sequenzvergleich von Mpa43 in verschiedenen Saccharomycotina.**

Sequenzvergleich der Mpa43-Proteinsequenz von *S. kudriavzevi* 14.89 (YGOB), *S. cerevisiae* Mpa43 (GB NP\_014150.1), *S. mikatae* 14.86 (YGOB), *K. waltii* Kwal\_33.13530 (YGOB), *Z. rouxii* ZYROOF16016g (YGOB) und *K. lactis* KLLAOC02937p (GB XP\_452328.1). Schwarze Boxen markieren identische und graue Boxen Aminosäuren, die nicht identisch sind, aber ähnliche Eigenschaften besitzen. Die Sequenzen stammen von den angegebenen Quellen (GB = Genbank; YGOB = Yeast Genome Order Browser, <http://ygob.ucd.ie/>). Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt und mit BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) bearbeitet. Das Bild „Abbildung A4“ befindet sich in digitaler Form auf der beigelegten CD.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen 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. Vor allem aber danke ich ihr für das zügige Lesen des ersten Manuskripts dieser Arbeit.

Ich danke außerdem der gesamten Arbeitsgruppe Molekulargenetik für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen thematischen und methodischen Belangen, für die gute Zusammenarbeit und das stets freundschaftliche Klima im Labor und im Büro.

Ein Dank gilt auch allen außerhalb der Arbeitsgruppe, ohne deren Kooperation viele Daten nicht verfügbar gewesen wären. Besonderer Dank gilt hier vor allem Ioana Lemnian für die Aufarbeitung der *Mircoarray*-Daten, die zwar immer viel zu tun hatte, aber stets ein offenes Ohr für die Fragen eines Nicht-Bioinformatikers besaß. An dieser Stelle danke ich auch Prof. Dr. Ivo Große für die Diskussionsbereitschaft und Gunnar Hoenig von der AG Entwicklungsgenetik für die schnelle Hilfe mit den Nukleosomendaten und der Einführung in IGV. Desweiteren danke ich Prof. Dr. Jürgen Heinisch für die Bereitstellung der „Curie Pool“-Genbank und Prof. Dr. Thomas Kriegel, Prof. Dr. Eckhard Boles, Prof. Dr. Ted Young sowie Dr. Alex Tsankov für die Beantwortung etlicher relevanter Fragen.

Zudem möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern, die mich zu stetiger Neugierde und Disziplin erzogen und die damit die besten Voraussetzungen geschaffen haben, diese Herausforderung absolvieren zu können. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Mann Falko, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit viel Rückhalt und Motivation gegeben hat.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), den 26. Januar 2017

---

Katharina Strödecke

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Katharina Strödecke  
Akademischer Grad: Master of Science  
Geburtsdatum: 12. 02. 1988  
Geburtsort: Leipzig  
Anschrift: Lauchstädter Straße 11B, 06110 Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Bildungsgang

08/1998 – 07/2006 Gymnasium Uhlandschule Leipzig  
Abschluss: Abitur

10/2007 – 09/2010 Biologie-Bachelorstudium an der MLU Halle-Wittenberg.  
Bachelorarbeit in Abteilung für Entwicklungsgenetik,  
Thema: „Molekulargenetische Analysen zur Lokalisierung des  
endogenen bzw. transgen überexprimierten Chromatin-  
*remodeling*-Faktors ATRXL1“  
Abschluss: Bachelor of Science

07/2009 – 08/2009 Mongolei-Expedition (Förderung durch DAAD)

10/2010 – 09/2012 Biologie-Masterstudium an der MLU Halle-Wittenberg.  
Masterarbeit in Abteilung für Entwicklungsgenetik,  
Thema: „Untersuchungen zum Einfluss epigenetischer Faktoren  
auf Nukleosomenpositionierung und Nuklease-Aktivität in  
*Arabidopsis thaliana*“  
Abschluss: Master of Science (Biologie)

seit 10/2012 Promotionsstudium an der MLU Halle-Wittenberg.  
Abteilung für Molekulargenetik  
Thema: „Konsequenzen der Genomduplikation in Hefe:  
Vergleichende Analysen zur kohlenstoffregulierten  
Transkription in post- und pre-WGD (*whole genome  
duplication*) Hefespezies“

Halle (Saale), den 26. Januar 2017