

Institut für Lebensmitteltechnologie
Fachgebiet Gärungstechnologie
Universität Hohenheim

Effekt der Überproduktion von Enzymen des Glucosestoffwechsels
auf das Wachstum und die Alkoholbildung in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät Naturwissenschaften
der Universität Hohenheim

vorgelegt von
Markus Emili
aus Münsingen

2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 28.07.2006 von der Fakultät I der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2006

Dekan:	Prof. Dr. H. Breer
1. Bericht und Prüfer:	Prof. Dr. J. Heinisch
2. Bericht und Prüfer:	PD Dr. T. Senn
3. Prüfer:	Prof. Dr.-Ing.habil. Dr.h.c. V. Kottke

To the Emili Family

Freude heißt die starke Feder
in der ewigen Natur.

Freude, Freude treibt die Räder
in der großen Weltenuhr.

(F. Schiller)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Glucosestoffwechsel in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.1.1	Zuckertransport über die Zytoplasmamembran	8
1.1.2	Phosphorylierung der Hexosen	9
1.1.3	Phosphoglucoseisomerase	9
1.1.4	Phosphofruktokinase	10
1.1.5	Fructose-1,6-bisphosphataldolase (Aldolase)	10
1.1.6	Triosephosphatisomerase	11
1.1.7	Triosephosphatdehydrogenase (Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase; GapDH)	11
1.1.8	Phosphoglyceratkinase	13
1.1.9	Phosphoglyceratmutase	13
1.1.10	Enolase	13
1.1.11	Pyruvatkinase	13
1.1.12	Pyruvatdecarboxylase.....	14
1.1.13	Alkoholdehydrogenase.....	15
1.2	Regulation der Glykolyse in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.2.1	Transkriptionsregulation	16
1.2.2	Translationskontrolle.....	19
1.2.3	Posttranslationelle Regulationsmechanismen	19
1.3	Übergeordnete Regulationsnetzwerke.....	21
1.4	Molekulargenetische Ansätze zur Steigerung der Ethanolproduktion.....	23
1.5	Mathematische Modellierung des Glucoseabbaus durch Hefe	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> K12-Stamm und Nährmedien	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme und Nährmedien.....	27
2.1.3	Plasmide und Oligonukleotide	29
2.1.4	Restriktionsenzyme	33
2.1.5	Lösungen für Enzymtests, DNA- und RNA-Arbeiten	33
2.1.6	Lösungen für "Mini-Plasmid-Isolierungen"	34
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Kreuzungen von Hefestämmen, Tetradenpräparation und Paarungstypbestimmung	35
2.2.2	Konstruktion von diploiden Doppeltransformanten.....	35
2.2.3	PCR ("Polymerase Chain Reaction").....	37
2.2.4	Restriktionsanalyse.....	37
2.2.5	Gelisolierung	38
2.2.6	Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.2.7	Transformation von Hefe	38
2.2.8	Isolierung genomischer DNA aus Hefe	39
2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.2.10	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	39
2.2.11	Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen	40
2.2.12	Bestimmung des Proteingehalts in Rohextrakten.....	40
2.2.13	Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Glykolyseenzyme.....	40
2.2.14	Berechnung der spezifischen Aktivitäten der Glykolyseenzyme.....	44
2.2.15	Sequenzierungen	44
2.2.16	"Real-Time"-RT-PCR	44
2.2.17	Aufnahme von Wachstumskurven	47
2.2.18	Bestimmung von $Y_{(P/X)}$, $Y_{(S/X)}$, $Y_{(P/S)}$, μ und g mit HPLC.....	47
2.2.19	Nachweis der Plasmide in den Hefestämmen	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Plasmidkonstruktionen	51

3.1.1	Konstruktionen zur gleichzeitigen Überproduktion der an der Glucoseverwertung beteiligten Enzyme.....	51
3.1.2	Konstruktionen zur Sequenzierung relevanter Bereiche der erhaltenen Plasmide	66
3.2	Untersuchungen zur Genexpression <i>in vivo</i>	73
3.2.1	Enzymatische Bestimmungen im Zuge der Konstruktionen der pMHE-Plasmide	73
3.2.2	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei zunehmender Komplexität der pMHE-Plasmide.....	75
3.2.3	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in Transformanten mit allen plasmidkodierten Genen.....	77
3.2.4	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in Transformanten des diploiden Laborstammes und von Industriestämmen.....	79
3.2.5	Komplementation von Mutanten mit defektem Glucosetransport durch pMHE8-3.....	81
3.2.6	Transkriptionsmessungen.....	82
3.3	Konstruktion eines diploiden Rezipienten zur Plasmidselektion auf komplexen Medien.....	87
3.4	Untersuchungen zu Wachstum und Glykolysefluss.....	91
3.4.1	Einfluß der Überexpression verschiedener Gene auf das Wachstum	91
3.4.2	Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf den Glykolysefluss.....	95
4	Diskussion.....	102
4.1	Konstrukte zur Überproduktion von Glykolyseenzymen.....	102
4.2	Untersuchungen zur Genexpression <i>in vivo</i>	104
4.2.1	Enzymatische Bestimmungen im Zuge der Konstruktionen der pMHE-Plasmide	104
4.2.2	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei zunehmender Komplexität der pMHE-Plasmide.....	105
4.2.3	Komplementation von Glucosetransport-Mutanten und Bestimmung der mRNA-Konzentration von <i>HXT1</i> und <i>TDH2</i>	107

Inhaltsverzeichnis

4.3	Konstruktion eines diploiden Rezipienten zur Plasmidselektion auf komplexen Medien.....	109
4.4	Untersuchungen zu Wachstum und Glykolysefluss.....	109
4.4.1	Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf das Wachstum	109
4.4.2	Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf den Glykolysefluss...	111
4.4.3	Allgemeine Betrachtungen und Ausblick	113
5	Zusammenfassung.....	116
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Abkürzungsverzeichnis	131
	Anhang I – Sequenzierung von <i>TDH2</i>	132
	Anhang II – Sequenzierung von <i>HXT1</i>	136
	Anhang III – Sequenzierung von <i>PFK1_{atp}</i>	140
	Lebenslauf	
	Erklärung	
	Danksagung	

1 Einleitung

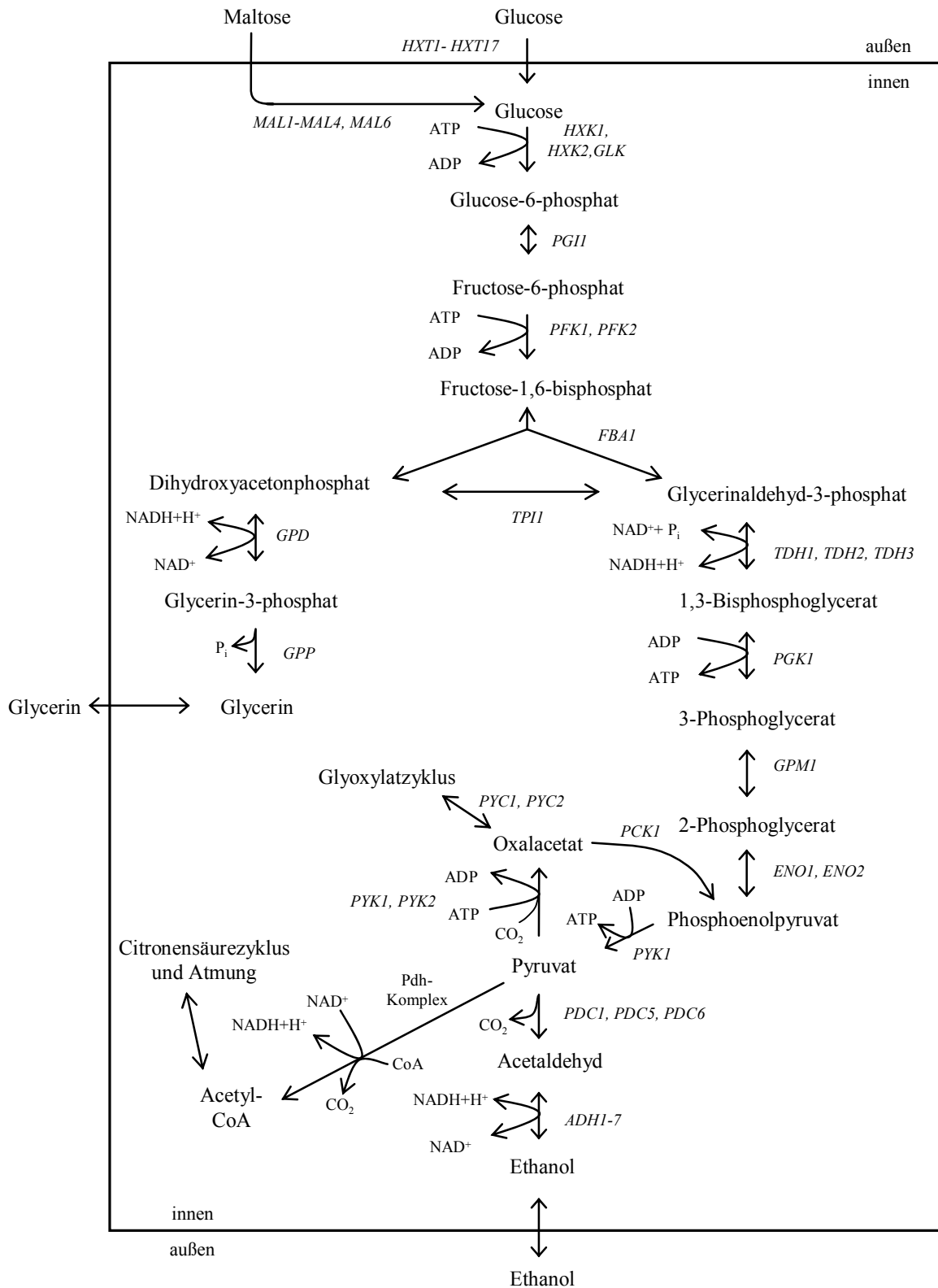
Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (abgeleitet aus lat. *saccharum* = Zucker, *myces* = Pilz, *cervisia* = Bier) wird seit Jahrtausenden in vielfältiger Weise zur Herstellung von Lebens- und Genussmitteln genutzt. Neben den traditionellen Anwendungen zur Teiglockerung in der Bäckerei und in der Herstellung von alkoholischen Getränken wie Bier, Wein und Spirituosen gewinnt die Produktion von Industriealkohol zunehmend an Bedeutung. Dieser wird fast ausschließlich aus der alkoholischen Vergärung von Zuckern durch Hefe gewonnen (Lin und Tanaka, 2006). In der chemischen Industrie wird Industriealkohol als Lösungsmittel und Veresterungskomponente verwendet (Schröter *et al.*, 1995). In den letzten Jahren rückt auch die Nutzung von Ethanol als Kraftstoff für Motoren zunehmend in den Vordergrund. So hat die Diskussion um die Förderung der regenerativen Energiegewinnung in den letzten Jahren stark zugenommen und die Erzeugung von Ethanol aus nachwachsenden Rohstoffen nimmt dabei eine besondere Stellung ein. In Brasilien werden Kraftfahrzeuge schon seit Jahren mit Ethanol angetrieben, und auch in den USA ist mittlerweile die Ethanolbeimischung zu Benzin üblich. Die erwartete Zunahme der Welt-Ethanolproduktion von 44,9 in 2005 auf 50 Mrd. Liter in 2006 demonstriert die Dynamik des Bioethanolmarktes (F.O. Licht, 2006) und erklärt das gesteigerte Interesse an der technologischen Verbesserung der Ethanolproduktion. Dabei beruht der Großteil der Produktion auf der Verarbeitung von stärkehaltigen Rohstoffen. Die Technologie der Rohalkoholerzeugung aus stärkehaltigen Rohstoffen ist bereits weitgehend etabliert und an den Verarbeitungsschritten mit Aufschluss der Rohstoffe, Gewinnung von vergärbaren Zuckern und der sich an die Gärung anschließenden Destillation sind nur noch marginale Verbesserungen zu erwarten. Hier konzentriert sich die Forschung auf die Verarbeitung bisher nicht genutzter cellulosehaltiger Rohstoffe, die aus der Land- und Forstwirtschaft sowie angrenzenden Industriezweigen günstig und in großen Mengen anfällt (Lin und Tanaka, 2006).

Die erhaltenen Zucker werden durch die Hefe *S. cerevisiae* im Zuge der Gärung in Ethanol und Kohlendioxid umgesetzt. Dabei kommen für den jeweiligen Rohstoff mehr oder weniger optimierte Reinzuchthefen zum Einsatz. Letztere sind genetisch nicht näher definiert und einer gezielten Modifikation, die eventuell zu einer Steigerung der Gärleistung beitragen könnte, kaum zugänglich (Schehl *et al.*, 2004). Von besonderem Interesse sollte dabei die Geschwindigkeit sein, mit der die vergärbaren Zucker in Ethanol überführt werden. Dazu sind der Zuckertransport in die Zelle, die Reaktionen der Glykolyse mit der sich anschließenden Decarboxylierung des Pyruvats und der Ethanolbildung von zentraler Bedeutung.

Die Biochemie der Glykolyse wurde zuerst in zellfreien Hefeextrakten untersucht und aufgeklärt (Barnett, 2003). Dies führte zu der in Abb. 1.1.1 gezeigten Abfolge enzymatischer Reaktionen. Die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für den Hefemetabolismus wurde durch genetische Untersuchungen deutlich. So sind die meisten Mutanten mit Defekten in Glykolyseenzymen nicht mehr in der Lage, auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Ciriacy und Breitenbach, 1979). Durch Komplementation dieses Phänotyps mit Hilfe von Genbanken wurden die für diese Enzyme kodierenden Gene bereits frühzeitig isoliert (Schwelberger *et al.*, 1989). Mit dem Fortschritt in der molekularen Hefegenetik und der seit 1996 vorliegenden vollständigen Genomsequenz wurde die gezielte Überexpression jedes Hefegens in Laborstämmen von *S. cerevisiae* möglich (Heinisch, 1986a; Zagulski *et al.*, 1998; Schaaff *et al.*, 1989). Allerdings sind die in der industriellen Alkoholproduktion genutzten Hefen genetisch nicht näher charakterisiert und sehr heterogen (Benitez *et al.*, 1996). Oft werden aneuploide Stämme als Reinzuchthefen verwendet (Cardinali und Martini, 1994), die nur schlecht sporulieren (Maraz, 2002). Dies erschwert die gezielte Manipulation solcher Stämme erheblich, die bei Laborstämmen keinerlei Problem darstellt (Guthrie und Fink, 1991). Letztere sind derzeit nicht in der technischen Anwendung, da Laborstämmen sowohl eine schlechtere Ethanolproduktion als auch die Bildung unerwünschter Aromakomponenten bei der Produktion alkoholischer Getränke nachgesagt wird (Walker, 1998). Solche negativen Attribute konnten allerdings bei Untersuchungen in unserem Labor für einen diploiden Laborstamm weder in Bezug auf die Alkoholausbeute noch auf die sensorischen Eigenschaften von Steinobst-Bränden nachgewiesen werden (Schehl *et al.*, 2004). Dies eröffnet die Möglichkeit des Einsatzes solcher genetisch definierter Laborstämmen in der industriellen Anwendung.

Im Folgenden sollen zunächst die biochemischen und genetischen Grundlagen des Glucosestoffwechsels von *S. cerevisiae* erläutert werden, bevor detailliert auf die Glykolyse und die sich anschließenden enzymatischen Reaktionen eingegangen wird. Dabei werden Enzymbezeichnungen so verwendet, dass sie weitgehend den genetischen Abkürzungen entsprechen.

Abb. 1.1.1 Die Glykolyse in *Saccharomyces cerevisiae*



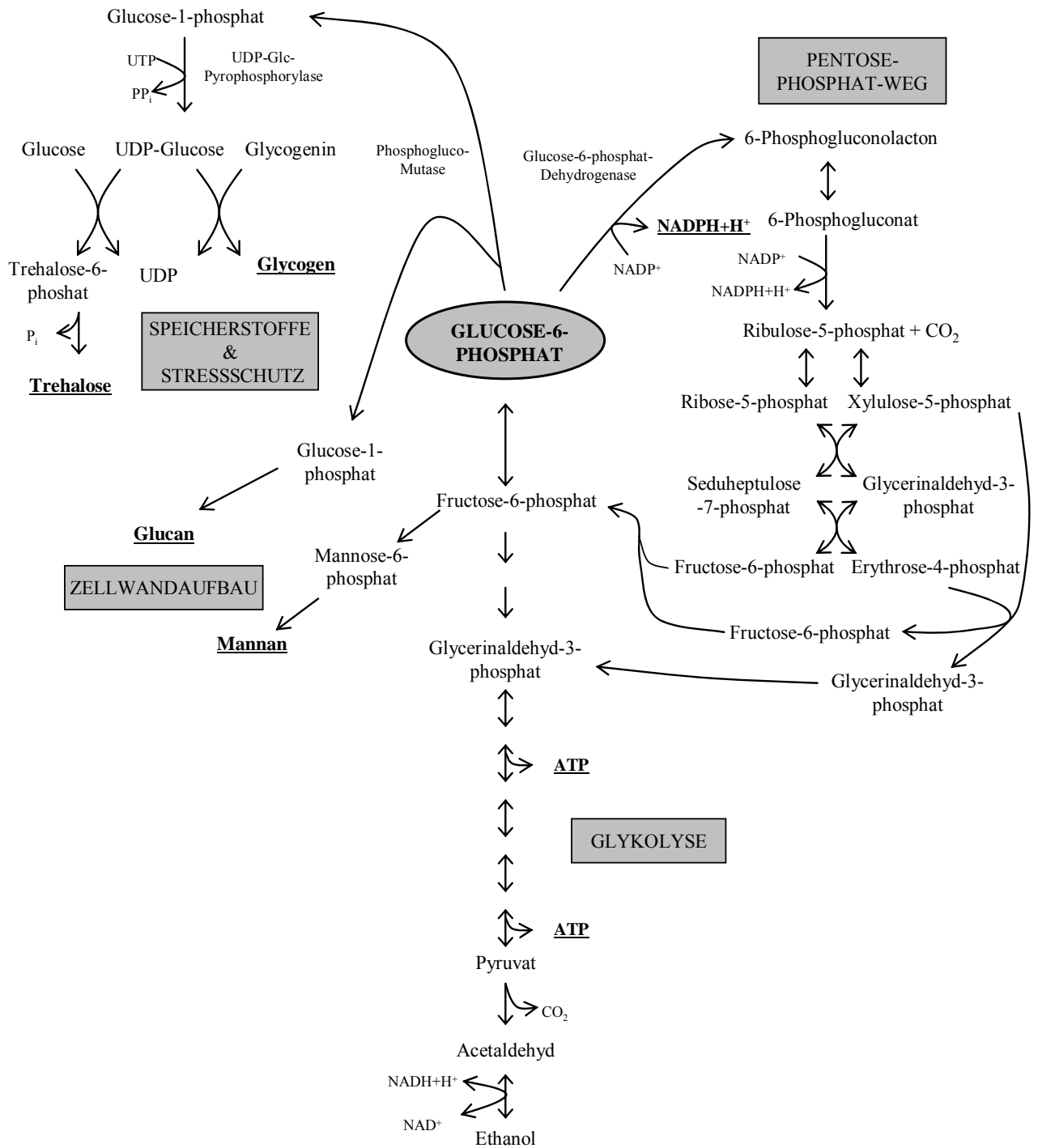
Glykolyse mit Hexosetransportern (*HXT1-17*) bzw. Maltosetransportern und Maltase (*MAL1-4, MAL6*), Hexokinasen (*HXK1/2, GLK*), Phosphoglucoseisomerase (*PGI1*), Phosphofruktokinase (*PFK1/2*), Fructose-1,6-bisphosphataldolase (*FBA1*), Triosephosphatisomerase (*TPI1*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*TDH1-3*), Phosphoglyceratkinase (*PGK1*), Phosphoglyceratmutase (*GPM1*), Enolase (*ENO1-2*), Pyruvatkinase (*PYK1*). Alkoholische Gärung mit Pyruvatdecarboxylase (*PDC1,5,6*) und Alkoholdehydrogenase (*ADH1-7*). Verbindung mit Citronensäurezyklus und Atmungskette über Bildung von Acetyl-CoA durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex, Verbindung mit Glyoxylatzyklus über die Bildung von Oxalacetat durch Pyruvatcarboxylase (*PYC1/2*), und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*PCK1*)

1.1 Der Glucosestoffwechsel in *Saccharomyces cerevisiae*

Glucose wird durch die Hefe zum größten Teil (> 80%; (Fraenkel, 1982)) über den Embden-Meyerhoff-Weg ("Glykolyse") abgebaut. Unter Glykolyse im engeren Sinn ist die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat unter Bildung von ATP als elementarem Energielieferanten (Substratkettenphosphorylierung) für den zellulären Metabolismus zu verstehen (Schlegel, 1992). Im Falle der alkoholischen Gärung wird das gebildete Pyruvat weiter zu CO₂ und Ethanol umgesetzt. Dabei wird bei der Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol NAD⁺ durch die Alkoholdehydrogenase regeneriert, das zuvor von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu NADH+H⁺ reduziert wurde. Die Glykolyse einschließlich der alkoholischen Gärung ist somit rein stöchiometrisch oxidoreduktiv neutral.

Während der Substratkettenphosphorylierung auf dem Weg zum Ethanol werden in der Glykolyse zwei ATP pro Glucosemolekül gewonnen. In Hefe können bei der Umsetzung von Pyruvat über den Citratcyclus und die Atmungskette dagegen etwa 34 ATP pro Glucosemolekül gewonnen werden, da in *S. cerevisiae* der Komplex I der Atmungskette nicht vorhanden ist (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Zusammen mit der Beobachtung von Pasteur, dass unter aeroben Bedingungen mehr Hefemasse aus Glucose gebildet wird als unter anaeroben Bedingungen, führte dies zur Postulierung des so genannten "Pasteur-Effektes". Formal biochemisch wurde argumentiert, dass in Gegenwart von Sauerstoff aufgrund der höheren Energieausbeute die Gärung zugunsten der Atmung reduziert wird. Genau dies ist allerdings für die Hefe *S. cerevisiae* nicht der Fall (Lagunas *et al.*, 1982). Sie bildet in zuckerhaltigen Lösungen auch in Gegenwart von Sauerstoff Kohlendioxid und Ethanol. Vielmehr ist die von Pasteur beobachtete Reduktion im Wachstum unter anaeroben Bedingungen darauf zurückzuführen, dass so genannte "survival factors", wie z.B. das für die Membransynthese notwendige Ergosterol, nur unter Beteiligung von Sauerstoff gebildet werden können und die Hefen unter anaeroben Bedingungen nach Verbrauch der intrazellulären Reserven dieser Stoffe das Wachstum einstellen (Bisson, 1993). Ein fermentativer Stoffwechsel auch in Gegenwart von Sauerstoff wird als "Crabtree-Effekt" bezeichnet und liegt bei *S. cerevisiae* vor, im Gegensatz zu vielen anderen Hefen, wie etwa der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* oder den in der Gärungstechnologie häufig anzutreffenden Kahlmhefen (Fredlund *et al.*, 2004). Erst bei sehr niedrigen Zuckerkonzentrationen (< 0,05%) stellt *S. cerevisiae* ihren Stoffwechsel von Gärung auf Atmung um, sodass man unter diesen außergewöhnlichen Bedingungen einen Pasteur-Effekt im Sinne der oben gegebenen Definition beobachten kann (Fiechter *et al.*, 1981).

Abb. 1.1.2 Die Stellung von Glucose-6-phosphat im Kohlenhydratstoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*

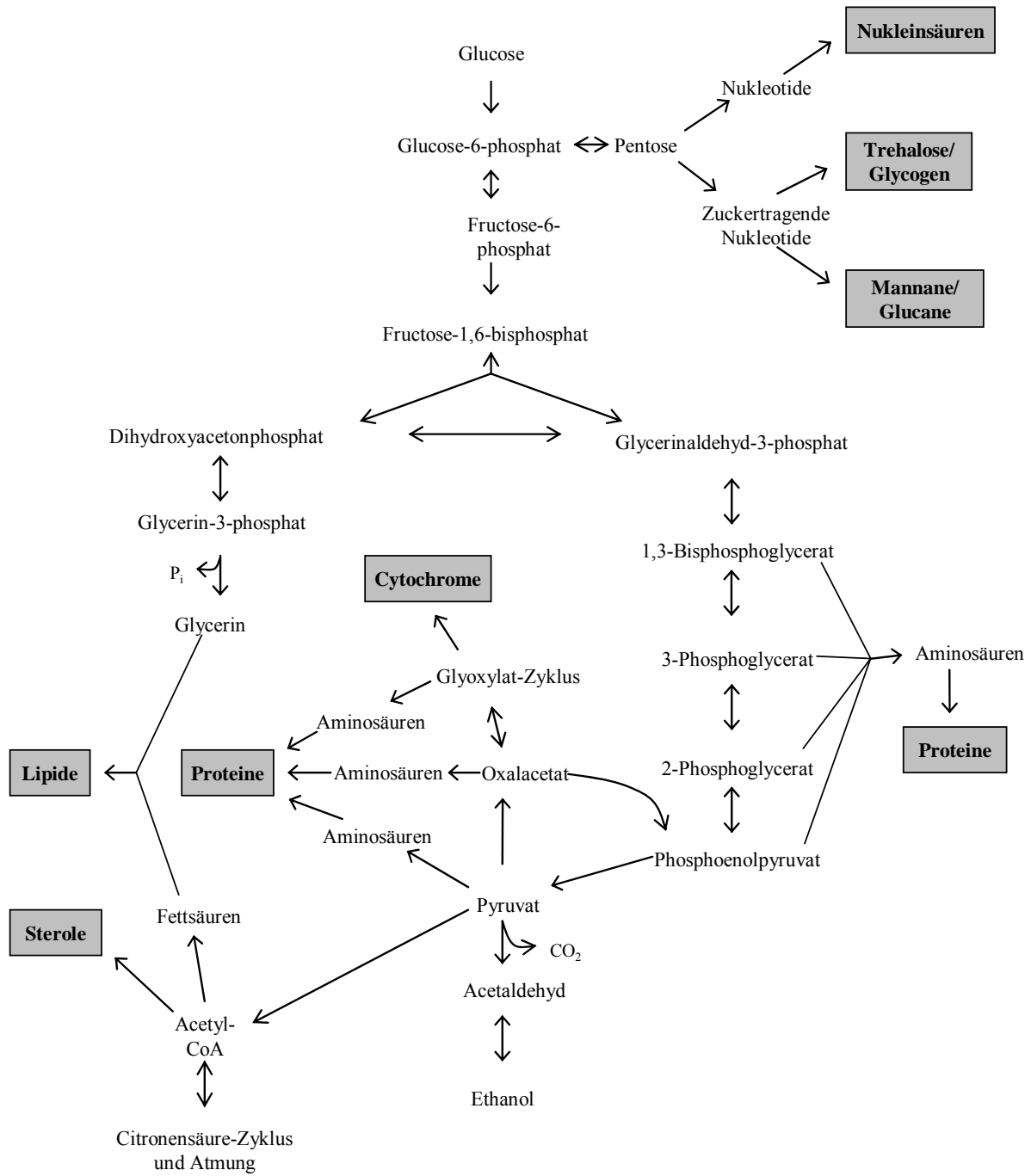


Glucose-6-phosphat ist Ausgangspunkt für die Glykolyse zur Gewinnung von ATP, für den Pentosephosphatweg zur Gewinnung von NADPH und Vorstufen der Aminosäure und Nucleotidsynthese, für den Aufbau von Speicherstoffen (Glykogen), Stressschutzstoffen (Trehalose) und für den Zellwandaufbau (Glucan, Mannan), wobei Mannan analog zur Bildung von Glucanen aus Fructose-6-phosphat gewonnen wird.

Von den Intermediaten der Glykolyse dient das zunächst gebildete Glucose-6-phosphat als Ausgangspunkt für eine Reihe weiterer metabolischer Prozesse (Abb. 1.1.2). So benötigt die Hefe für die Biosynthese von Nucleinsäuren und Aminosäuren Reduktionsäquivalente in Form von NADPH. Dieses wird aus der Umsetzung von Glucose-6-phosphat im oxidativen Teil des Pentosephosphat-Weges generiert. Darüber hinaus liefern Glucose- und Fructose-6-phosphat die monomeren Bestandteile für die Zellwandbiosynthese in Hefe, die sich aus Glucanen, Mannoproteinen und einem geringen Chitinanteil zusammensetzen (Kapteyn *et al.*, 2000). Auch hierbei handelt es sich um einen essentiellen Prozess, da es sich bei der Zellwand um die form- und stabilitätsgebende Komponente von Hefezellen handelt. Defekte in der Regulation der Zellwandbiosynthese führen in der Regel zur Zellyse (Heinisch *et al.*, 1999). Schließlich nehmen auch die Synthese des Speicherkohlenhydrats Glykogen und die von Trehalose, deren Funktion hauptsächlich im Stress-Schutz gesehen wird, ihren Ausgang im Glucose-6-phosphat (Francois und Parrou, 2001). Daher wurde dieses Zuckerphosphat auch als Drehscheibe für den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe bezeichnet (Gancedo und Serrano, 1989).

Darüber hinaus stellt die Glykolyse weitere Bausteine für die Biosynthese von Zellbestandteilen bereit (Abb. 1.1.3). So bilden Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat Ausgangsstoffe für die Synthese verschiedener Aminosäuren. Dihydroxyacetonphosphat wird über Glycerinphosphat zu Glycerin umgesetzt, das zusammen mit Fettsäuren zur Synthese von Lipiden benötigt wird. Die Fettsäuresynthese nimmt ihren Ausgang von Acetyl-CoA, das aus Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase-Reaktion entsteht.

Abb. 1.1.3 Die Stellung der Glykolyse im Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*



Die Glykolyse als Lieferant von Ausgangsstoffen für die Produktion von Zellbestandteilen. Aus dem Pentosephosphat-Weg leiten sich Bausteine für die Bildung von Nukleinsäuren, Trehalose, Glycogen, Glucanen und Mannanen ab. Metaboliten des unteren Teils der Glykolyse und des Glyoxylat-Zyklus' sowie Pyruvat und Oxalacetat dienen als Ausgangsstoffe für die Aminosäureproduktion und Proteinbildung. Cytochrome entstehen aus Verbindungen des Glyoxylat-Zyklus. Über Acetyl-CoA entstehen Sterole und Fettsäuren, die mit Glycerin zum Aufbau von Lipiden dienen.

1.1.1 Zuckertransport über die Zytoplasmamembran

Die von Hefe vergärbaren Kohlenhydrate (Saccharose, Maltose, Glucose und Fructose) werden über verschiedene Wege aus dem Wachstumsmedium aufgenommen (Heinisch und Hollenberg, 1993). Das Disaccharid Saccharose wird durch Invertase im periplasmatischen Raum in seine Monosaccharide Glucose und Fructose gespalten, die einzeln aufgenommen werden. Maltose wird mit Hilfe eines energieabhängigen Protonensymporters aufgenommen und intrazellulär durch die Maltase in zwei Glucosemoleküle zerlegt. Die Hexosen Glucose und Fructose werden mit Hilfe verschiedener Transporter durch erleichterte Diffusion aufgenommen. Das Genom von *S. cerevisiae* enthält 20 Gene, die aufgrund von Sequenzhomologien für Hexosetransporter kodieren könnten. Sie werden mit *HXT1* bis *HXT17*, *SNF3*, *RGT2* und *GAL2* bezeichnet (Boles und Hollenberg, 1997). Eine primäre physiologische Bedeutung wird dabei den von *HXT1-4* und von *HXT6,7* kodierten Transportern zugeschrieben. Dies beruht auf der Beobachtung, dass eine Mutante mit Defekten in den Genen *HXT1-7* nicht mehr in der Lage ist, auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Jedes der genannten sechs Transportergene ist dagegen in der Lage, ein solches Wachstum zu vermitteln, wenn es in die Mutante eingebracht wird (Reifenberger *et al.*, 1995). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass verschiedene Transporter bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Medium aktiv sind. Aufgrund biochemischer Daten wurden ursprünglich die zwei Gruppen der hoch- und der niederaffinen Glucosetransporter postuliert (Bisson und Fraenkel, 1983). Bei hohen Zuckerkonzentrationen, wie sie z.B. im Most bei der Weinbereitung auftreten (bis etwa 1,5M), erfolgt die Aufnahme über die so genannten "low-affinity-transporter", die konstitutiv, d.h. unabhängig von der im Medium angebotenen Kohlenstoffquelle, exprimiert werden. Die K_M -Werte dieser Transporter liegen zwischen 60mM für Hxt3 und 100mM für Hxt1 (Boles und Hollenberg, 1997). Bei sinkenden Glucosekonzentrationen im Medium werden zunehmend die "high-affinity-transporters" benutzt. Die K_M -Werte liegen hier um 1-2mM. Die Expression der Gene, die für diese hochaffinen Transporter kodieren, unterliegt der Glucoserepression. Niedrige Glucosekonzentrationen führen entsprechend zur Derepression der Transkription der Transportergene über einen Mechanismus, an dem das Snf3-Protein beteiligt ist. Dagegen wird z.B. das für den niederaffinen Transporter Hxt1 kodierende Gen bei hohen Glucosekonzentrationen verstärkt exprimiert. Hierbei ist das Rgt2-Protein beteiligt, das den transkriptionellen Repressor Rgt1 so verändert, dass er zu einem Aktivator der Transkription von Genen wird, die für die niederaffinen Glucosetransporter kodieren (Boles und Hollenberg, 1997).

1.1.2 Phosphorylierung der Hexosen

Im Gegensatz zu Bakterien, bei denen im so genannten Phosphotransferase-System die Hexosephosphorylierung direkt mit dem Transport gekoppelt ist, werden in Eukaryonten die Hexosen zunächst in die Zelle transportiert und anschließend unter ATP-Verbrauch phosphoryliert (Karlson *et al.*, 1994). Dieser Schritt ist bei physiologischen Bedingungen irreversibel (Heinisch und Hollenberg, 1993). In *S. cerevisiae* kodieren die Gene *HXK1*, *HXK2* und *GLK1*, für zwei Isoenzyme der Hexokinase, die neben Glucose auch Fructose und Mannose in die entsprechenden Zuckerphosphate umsetzen, sowie für eine Glucose-spezifische Glucokinase. Entsprechend wachsen *hxx1/hxx2*-Doppelmutanten nicht mehr auf Fructose, wohl aber auf Glucose (Maitra, 1970). Erst die Dreifachmutante *hxx1 hxx2 glk1* wächst weder auf den monomeren Hexosen, noch auf Maltose, Saccharose oder Trehalose. Ein Wachstum auf Galaktose ist dagegen noch möglich, da diese über den alternativen Leloir-Stoffwechselweg letztlich in Glucose-6-phosphat umgesetzt wird. Die beiden Isoformen der Hexokinase werden auf verschiedenen Kohlenstoffquellen unterschiedlich stark exprimiert. So überwiegt die intrazelluläre Konzentration von Hxk2 (Hexokinase B oder P-II) in auf Glucose gewachsenen Zellen deutlich die der Hxk1 (Hexokinase A oder P-I). Umgekehrt übersteigt die Menge von Hxk1 deutlich die von Hxk2 in Zellen, die mit Ethanol als Kohlenstoffquelle angezogen wurden (Muratsubaki und Katsume, 1979). Da in der vorliegenden Arbeit der Hexoseabbau im Vordergrund steht, wurde hier versucht, die Expression des *HXK2*-Gens zu erhöhen.

1.1.3 Phosphoglucoseisomerase

Die Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat ist der erste spezifische Schritt der Glykolyse und gleichzeitig der letzte der Gluconeogenese, in der Glucose-6-phosphat das Endprodukt ist und zur Bereitstellung von Monomeren für die Zellwandbiosynthese und den Aufbau von Speicherkohlenhydraten dient. Diese reversible Reaktion unterliegt keinerlei bekannten allosterischen Regulationsmechanismen. Mutanten mit Defekten in der Phosphoglucoseisomerase (kodiert von *PGII*) wachsen nicht mehr auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. Dies wird auf die Anhäufung von Glucose-6-phosphat zurückgeführt, für dessen Abbau die Kapazität des Pentosephosphat-Weges nicht ausreicht (Aguilera, 1986). Umgekehrt wachsen entsprechende Mutanten nur dann auf Fructose, wenn Glucose in geringen Mengen zugesetzt wird (0.05%), durch die der Bedarf an Glucose-6-phosphat gedeckt werden kann.

1.1.4 Phosphofruktokinase

Die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat ist der erste irreversible Schritt, der für die Glykolyse spezifisch ist. Aus formal biochemischen Erwägungen wurde daher abgeleitet, dass es sich hierbei um einen wichtigen Kontrollpunkt des Glykolyseflusses handelt (Sols, 1981). Diese Annahme wird durch die vielfältige allosterische Regulation der Phosphofruktokinase-Aktivität gestützt. Als die wichtigsten Effektoren sind hier die positive Regulation durch AMP und Fructose-2,6-bisphosphat zu nennen. Andererseits hemmt ATP in höheren Konzentrationen das Enzym (Sols, 1981). Die Phosphofruktokinase ist ein heterooktamer Enzym, das sich aus 4 α - und 4 β -Untereinheiten zusammensetzt. Diese sind durch die Gene *PFK1* und *PFK2* kodiert (Heinisch, 1986a). Die aus den kodierenden Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind zwischen den Untereinheiten zu etwa 50% identisch und führten zu der Vermutung, dass in der Evolution zunächst eine Genduplikation stattfand, die zunächst die etwa doppelte Größe der eukaryontischen Enzymuntereinheiten im Vergleich zu denen der Prokaryonten erklärt. In Hefe wird angenommen, dass darauf eine weitere Genduplikation folgte, die zur Trennung von *PFK1* und *PFK2* auf verschiedenen Chromosomen führte (Heinisch, 1986b). Untersuchungen mit gezielten Veränderungen einzelner Aminosäuren zeigten, dass beide Untereinheiten sowohl die katalytische Funktion ausüben können, als auch die allosterischen Effektoren binden (Arvanitidis und Heinisch, 1994; Heinisch *et al.*, 1996; Rodicio *et al.*, 2000). Fructose-2,6-bisphosphat und AMP scheinen dabei die Hemmung durch ATP aufzuheben. Obwohl Mutanten mit Defekten in einem der beiden *PFK*-Gene keine Enzymaktivität *in vitro* zeigen, sind sie in der Lage, auf Glucose zu wachsen und diese zu Ethanol und Kohlendioxid zu vergären (Breitenbach-Schmitt *et al.*, 1984). Dies wird auf eine enzymatische Funktion der verbliebenen funktionellen Untereinheiten *in vivo* zurückgeführt (Arvanitidis und Heinisch, 1994). Erst die Doppelmutante mit Defekten in beiden Genen (*pfk1 pfk2*) ist nicht mehr in der Lage, in Gegenwart von Glucose zu wachsen.

1.1.5 Fructose-1,6-bisphosphataldolase (Aldolase)

Im nächsten Schritt der Glykolyse werden Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) mit Hilfe der Aldolase gebildet. Bei dem Enzym handelt es sich um ein Zink-abhängiges Homodimer, für das keine allosterischen Regulationsmechanismen bekannt sind. In genetischen Untersuchungen wurden zunächst Mutanten mit reduzierter Aldolase-Aktivität isoliert, die nicht mehr in der Lage sind, auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Lobo, 1984). Nach der Klonierung des kodierenden *FBA1*-Gens führte die Disruption zum vollständigen Verlust der Enzymaktivität

und der Fähigkeit zum Wachstum auf Glucose (Schwelberger *et al.*, 1989). Das beste Wachstum zeigten solche Disruptanten in Medium mit Acetat und einem geringen Galaktosezusatz. Das Gen wird konstitutiv, d.h. unabhängig von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle, exprimiert (Compagno *et al.*, 1991).

1.1.6 Triosephosphatisomerase

Die Monophosphate Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), die durch die Aldolase gebildet wurden, stehen durch die Katalyse der Triosephosphatisomerase im Gleichgewicht, das thermodynamisch stark auf Seiten des DHAP liegt. Durch die ständige Umsetzung von GAP in der Glykolyse, wird der Stofffluss unter physiologischen Bedingungen trotzdem in diese Richtung geleitet. Die Triosephosphatisomerase weist die höchste spezifische Enzymaktivität aller Glykolyseenzyme auf (Uemura und Fraenkel, 1990). Die erste Mutante wurde als Glucose-negativ isoliert und war extrem empfindlich gegenüber niedrigen Glucosekonzentrationen, was zu einer Anhäufung von DHAP führte.

1.1.7 Triosephosphatdehydrogenase (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GapDH)

Im Folgenden wird GAP gleichzeitig oxidiert und phosphoryliert, so dass Glycerat-1,3-diphosphat gebildet wird. Für diesen reversiblen Schritt werden NAD^+ und anorganisches Phosphat benötigt. Drei Isoformen des Enzyms werden von *TDH1-TDH3* kodiert. Das funktionelle Enzym ist ein Heterotetramer (Holland und Westhead, 1973) aus 4 Einheiten zu 36kDA. Generell gelten die Gene *TDH1-3* als konstitutiv exprimierte Gene, wobei *TDH1* mit 10-15% den geringsten Anteil an den Isoenzymen bildet. *Tdh2* und *Tdh3* liegen mit 25-30% bzw. 50-60% in höheren Konzentrationen vor (McAllister und Holland, 1985). Mutanten mit Defekten in einem der drei Gene wachsen noch auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle, wenn auch im Falle der *tdh2*- und *tdh3*-Mutanten deutlich langsamer. Doppelmutanten des Typs *tdh2 tdh3*, bei denen nur noch das *TDH1*-Gen intakt ist, wachsen dagegen nicht mehr. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Transkription von *TDH1* durch reduktiven Stress induziert wird (Valadi *et al.*, 2004). *TDH2* und *TDH3* hingegen sind konstitutiv exprimiert, was sich in einem nur geringen Unterschied der Enzymaktivität in Zellen äußert, die auf vergärbaren im Vergleich zu nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen angezogen wurden (Uemura und Fraenkel, 1990; McAllister und Holland, 1985).

Tab. 1.1.1 An der alkoholischen Gärung beteiligte Proteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Protein	Gen	Oligomerstruktur	Substrat (K _M)	Allosterische Effektoren/ Cofaktoren	Mutanten-Phänotypen	Besonderheiten	Referenzen ^a
Hxt	<i>HXT1-16</i> <i>GAL2</i>	Monomer (63,2kDa)	Hxt1: Glu 100mM		<i>hxt1-hxt7</i> : Glc	Transporter mit 12 Transmembran-Domänen	(Boles und Hollenberg, 1997)
Hxk	<i>HXX2</i>	Homodimer (2x53,9kDa)	Glu: 0,2-0,23mM Fru: 1,7-1,9mM ATP: 0,1-0,12mM	(+): Citrat, D-Malat, Glycerat-3-P, P _i (-): Tre-6-P	<i>hxx1hxx2</i> : Fru ⁻ <i>hxx1 hxx2 glk</i> : Glc ⁻ , Fru ⁻ , Gal ⁺	Promotor-Bindestelle: Rgt1	(Menezes und Pudles, 1976; Entian <i>et al.</i> , 1985; Gancedo und Flores, 2004)
Pgi	<i>PGII</i>	Homodimer (2x61,3kDa)	Glu-6-P	--	Glc ⁻ , Fru ⁺	C ₂ ⁺ C ₃ ⁺ bei Glc >0,02%	(Green <i>et al.</i> , 1988)
Pfk	<i>PFK1</i> + <i>PFK2</i>	4α + 4β (4x108 kDa + 4x105 kDa)	Fru-6-P (0,2mM) ATP (0,xxmM)	F-2,6-P ₂ (+); AMP (+) ATP (-)	<i>pfk1</i> oder <i>pfk2</i> Glc ⁺ ; <i>pfk1</i> <i>pfk2</i> Glc	Einzelmutanten ohne Enzymaktivität <i>in vitro</i> , funktionelle Gärung <i>in vivo</i>	(Sols, 1981; Kopperschläger und Heinisch, 1997)
Fba	<i>FBA1</i>	Homodimer (40kDa)	Fru-1,6-P ₂	Zn ²⁺	Glu ⁺ langsam	Promotor- Bindestellen Rap1, Abf1,	(Sols, 1981; Compagno <i>et al.</i> , 1991)
Tpi	<i>TPI1</i>	Homodimer (26kDa)	DHAP und GAP	--	Glc-Anhäufung DHAP	Promotor- Bindestellen Rap1, Rebl, Gcr1	(Scott und Baker, 1993)
Gap-DH	<i>TDH1- TDH3</i>	Heterotetramer (4x36kDa)	GAP	NAD ⁺ ; P _i	<i>tdh2 tdh3</i> : Glc ⁻ ; <i>tdh2</i> : Glc ⁺ <i>tdh3</i> : Glc ⁺	Promotor- Bindestellen: Rap1, Gcr1, Grf2	(Holland <i>et al.</i> , 1987; Yagi <i>et al.</i> , 1994)
Pgk	<i>PGK1</i>	Monomer (45,0kDa)	1,3-Bisphosphoglycerat	--	Glc ⁻	Promotor- Bindestellen Rap1, Rebl, Gcr1, Abf1	(Huie <i>et al.</i> , 1992; Packham <i>et al.</i> , 1996)
Gpm	<i>GPM1</i>	Homotetramer (4x27kDa)	3-Phosphoglycerat	2,3-Bisphosphoglycerat	Glc ⁻	Promotor- Bindestellen: Gcr1	(Rodicio <i>et al.</i> , 1993)
Eno	<i>ENO1+ ENO2</i>	Homodimer (46,8kDa)	2-Phosphoglycerat	Mg ²⁺	<i>eno1</i> oder <i>eno2</i> Glc ⁺ <i>eno1</i> <i>eno2</i> : Glc ⁻	Promotor- Bindestellen: Gcr1, Rap1 und Abf1	(Holland <i>et al.</i> , 1987; Brindle <i>et al.</i> , 1990)
Pyk	<i>PYK1</i>	Homotetramer (4x54,5 kDa)	PEP: 0,09/1,8mM (m/o Fru-1,6-P ₂), ADP: 1,8/3,4 mM (m/o Fru-1,6-P ₂)	+ : Mg ²⁺ , Fru-1,6-P ₂ , PEP, ADP, K ⁺ , NH ₄ ⁺ - : Citrat, ATP	Glu ⁻ C ₂ ⁺ (reprimiert d. Glu)	Promotor-Bindestellen: Rap1, Abf1, Gcr1 Rebl 5'-leader (27 bp) in mRNA → Transkriptionskontrolle	(Boles, 1997; Drazinic <i>et al.</i> , 1996)
Pdc	<i>PDCL, PDC5,6</i>	Homotetramer (4x61,5kDa)	Pyruvat	Thiamin-Diphosphat, Mg ²⁺	<i>pdc1 pdc2 pdc6</i> : Glc ⁻ , Glc ⁺ mit 5% C ₂ -Komp.	Rap1, Gcr1, Gcr2	(Liesen <i>et al.</i> , 1996)
Adh	<i>ADH1-7</i>	Homotetramer (36,8kDa)	Acetaldehyd	Zn ²⁺ oder Fe ²⁺	<i>adh1</i> : Glc ⁺	Rap1, Gcr1	(Ciriacy, 1997; Huie <i>et al.</i> , 1992)

^a zitiert sind Übersichtsartikel, in denen die Verweise auf die Originalarbeiten zu finden sind. GAP= Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP= Dihydroxyacetonphosphat, PEP= Phosphoenolpyruvat, C₂, C₃= Kohlenstoffquellen mit 2 resp. 3 C-Atomen, P_i= anorganisches Phosphat

1.1.8 Phosphoglyceratkinase

Bei dem durch die Phosphoglyceratkinase katalysierten Schritt wird eine Phosphatgruppe des 1,3-Bisphosphoglycerats auf ADP übertragen, sodass es sich hier um den ersten Schritt der Energiegewinnung in der Glykolyse handelt. Das für die Phosphoglyceratkinase kodierende Gen (*PGKI*), ist eines der am stärksten exprimierten Hefegene und trägt bis zu 5% der gebildeten mRNA und des löslichen Zellproteins bei (Chambers *et al.*, 1989). Eine *pgk1*-Deletionsmutante wächst nicht mehr auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle und kann mit Glycerin und Ethanol angezogen werden.

1.1.9 Phosphoglyceratmutase

Die Phosphoglyceratmutase beschleunigt die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Glycerat-3-phosphat und Glycerat-2-phosphat. Das Enzym setzt sich aus funktionellen Dimeren zu einem Homotetramer zusammen (Tab. 1.1.1) und benötigt 2,3-Bisphosphoglycerat als Cofaktor. Mutanten mit defekter Phosphoglyceratmutase wachsen weder auf Glucose, noch auf Medium, das nur Ethanol oder Glycerin enthält, dafür aber auf einer Kombinationen aus Ethanol und Glycerin (Lam und Marmur, 1977). Dies wird darauf zurückgeführt, dass die hier katalysierte reversible Reaktion sowohl für die Glykolyse als auch für die Gluconeogenese essentiell ist. Das kodierende *GPM1*-Gen wird weitgehend konstitutiv exprimiert (Rodicio *et al.*, 1993).

1.1.10 Enolase

Im nächsten Schritt der Glykolyse wird 2-Phosphoglycerat mit Hilfe der Enolase in Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt. Für die Enolase sind zwei Isoenzyme beschrieben, die von den Genen *ENO1* und *ENO2* kodiert werden. Mutanten ohne Enolase-Aktivität wachsen nicht in Gegenwart von Glucose. Allerdings sind die Zellen auf einer Mischung aus Ethanol und Glycerin lebensfähig. Die Untersuchung der Expression der beiden Enolasegene zeigte für *ENO1* keinen Unterschied bei glykolytischen oder gluconeogenetischen Bedingungen. Für *ENO2* hingegen konnte eine 20fache Erhöhung der Expression bei Nutzung der Glykolyse gegenüber dem Wachstum auf gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen gezeigt werden (Cohen *et al.*, 1987).

1.1.11 Pyruvatkinase

Die Pyruvatkinase katalysiert den letzten Schritt der Glykolyse. Dabei wird Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Aufnahme eines Protons und durch Übertragung der Phosphatgruppe auf ADP in Pyruvat umgewandelt. Dies ist der zweite Schritt in der

Glykolyse, in dem ATP generiert wird und ist unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Pyruvatkinase gilt darum als ein weiterer Kontrollpunkt der Glykolyse (Boles, 1997). Entsprechend sind wieder eine Reihe allosterischer Effektoren beschrieben. Aktivierend wirken Fructose-1,6-bisphosphat, das Produkt der Phosphofruktokinase, ADP, PEP und Ammonium-Ionen, während Citrat und ATP die Aktivität hemmen (Haeckel *et al.*, 1968). Der stärkste Aktivator ist Fructose-1,6-bisphosphat, das schon in mikromolaren Bereichen wirkt und Erhöhungen der Enzymaktivität um den Faktor 1700 zur Folge haben kann (Hess und Haeckel, 1967; Morris *et al.*, 1986). Die Enzymaktivität hängt darüber hinaus wie bei allen Pyruvatkinasen von der Anwesenheit eines monovalenten (K^+ oder NH_4^+) und eines bivalenten (Mg^{2+}) Kations ab (Muirhead, 1987). Die Untereinheiten des homotetrameren Enzyms werden von dem *PYK1*-Gen kodiert. Das Gen wurde erstmals von Burke isoliert (Burke *et al.*, 1983) und später näher charakterisiert (McNally *et al.*, 1989). Das Produkt der Pyruvatkinase, Pyruvat, ist das Endprodukt der Glykolyse. Es kann entweder im Verlauf der alkoholischen Gärung weiter zu Ethanol umgesetzt, oder über die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA decarboxyliert und in den Citronensäurezyklus eingeschleust werden (Abb. 1.1.1).

1.1.12 Pyruvatdecarboxylase

Pyruvat wird im Zuge der alkoholischen Gärung zu Acetaldehyd decarboxyliert. Dabei wird CO_2 freigesetzt und anschließend der Aldehyd weiter zu Ethanol reduziert. Für die Pyruvatdecarboxylase sind in Hefe drei Isoenzyme beschrieben, bei denen es sich um Homotetramere handelt. Das von *PDC1* kodierte Protein stellt dabei beim Wachstum auf Glucose das quantitativ vorherrschende Isoenzym dar. Als Cofaktor wird Thiamindiphosphat, das auch als Co-Carboxylase bezeichnet wird, benötigt. Für die Untereinheiten der Isoenzyme sind drei kodierende Strukturgene beschrieben, die mit *PDC1*, *PDC5* und *PDC6* bezeichnet werden (Hohmann, 1997). Das *PDC1*-Gen, das für das vorherrschende Isoenzym kodiert, wird auf Glucosemedium um den Faktor 20 stärker exprimiert, als auf gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen. *PDC5* ist in der kodierenden zu *PDC1* homolog, wird jedoch viel schwächer bis gar nicht exprimiert. Erst in *pdcl*- Mutantenstämmen wird *PDC5* stärker exprimiert und ersetzt die Funktion von *PDC1* vollständig (Seeboth *et al.*, 1990). Bei *PDC6* handelt es sich um ein Pseudogen, das unter normalen Umständen nicht exprimiert wird (Hohmann, 1991). Es wird erst nach Rekombination mit einem funktionellen Promotor (i.d.R. aus *PDC5*) transkribiert. Bei Wachstum auf Ethanol hingegen wird es stark transkribiert, aus welchem Grunde ist allerdings noch unklar (Hohmann, 1991). In *pdcl pdc5 pdc6*- Mutanten ist langsames Wachstum auf Glucose zu verzeichnen, das auf die Restaktivität der

respiratorischen Enzyme zurückzuführen ist, da es in Gegenwart des Atmungshemmstoffs Antimycin A unterbunden werden kann. Die Bedeutung der Isoenzyme wird auch durch die Phänotypen entsprechender Nullmutanten deutlich. So sind *pdcl*-Deletionsmutanten nicht mehr in der Lage, auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

1.1.13 Alkoholdehydrogenase

Für die Alkoholdehydrogenase sind insgesamt sieben kodierende Gene beschrieben, *ADH1-7*. Es wird angenommen, dass die verschiedenen Isoenzyme für die Umsetzung verschiedener Alkohole zu Aldehyden benötigt werden. Bei den Alkoholdehydrogenasen handelt es sich um dimere Enzyme, wobei für Adh1 und Adh2 auch heterodimere Formen, die sich aus Untereinheiten beider Isoformen zusammensetzen, beschrieben wurden (Ciriacy, 1975). Als Cofaktor dient NADH, das im Schritt der GapDH in der Glykolyse gebildet wurde. Außerdem sind die Enzyme Zink-abhängig (Bergmeyer, 1974). Die für den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe und die vorliegende Arbeit wichtigste Umsetzung in diesem Zusammenhang ist die Bildung von Ethanol im Anschluss an die Glykolyse. Diese Reaktion wird in *S.cerevisiae* vorrangig von dem durch *ADH1* kodierten Isoenzym katalysiert (Denis *et al.*, 1983). Außerdem wurde beschrieben, dass *ADH5* an der Ethanolbildung in geringerem Umfang beteiligt ist (Smith *et al.*, 2004). Die zweite Aufgabe für Alkoholdehydrogenasen ist die Assimilation von Kohlenstoff in Form von Ethanol. Hierfür wird hauptsächlich das Adh2-Isoenzym genutzt (Ciriacy, 1979). Während die Expression des *ADH1*-Gens durch Glucose im Medium um den Faktor 4 induziert wird (Müller *et al.*, 1995), unterliegt *ADH2* der Glucoserepression, d.h. es wird nur bei Wachstum auf gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen transkribiert. Auch *ADH3* unterliegt der Glucoserepression. Das hiervon kodierte Isoenzym ist im Gegensatz zu den bisher beschriebenen cytoplasmatischen Proteinen jedoch in den Mitochondrien lokalisiert (Young und Pilgrim, 1985). Bei Adh4 handelt es sich um eine Formaldehyd-Dehydrogenase, die für die Ethanolbildung ohne Bedeutung ist (Drewke *et al.*, 1990). Für die Isoenzyme aus den Genen *ADH6* und *ADH7* werden aufgrund des breiten Wirkungsspektrums die Beteiligung an der Aldehydtoleranz (*ADH6*) und für beide die Bildung von Fuselalkoholen diskutiert. Eine weitere Aufgabe der Alkoholdehydrogenasen besteht in der Reduktion von langkettigen Aldehyden zu höheren Alkoholen, den Fuselalkoholen, im Rahmen des Aminosäureabbaus. Zur Katalyse dieses Schrittes sind alle oben beschriebenen *ADH*-Genprodukte sowie weitere Alkoholdehydrogenasen in der Lage (Dickinson *et al.*, 2003).

1.2 Regulation der Glykolyse in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Glykolyse ist der zentrale Stoffwechselweg für die Gewinnung von Energie in Form von ATP aus Kohlenhydraten, der sowohl in der alkoholischen Gärung als auch für die Atmung genutzt wird. Der Unterschied besteht in der Verarbeitung des Endproduktes, des Pyruvats. Bei der alkoholischen Gärung wird es über Acetaldehyd zu Ethanol reduziert (Abb. 1.1.1). Andererseits kann Pyruvat in aerob wachsenden Zellen über den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex, der es oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert, in den Citronensäurezyklus eingeschleust werden (Stryer, 1996). Wie bereits erwähnt, wird dieser Weg in *S. cerevisiae* bei hohen Hexosekonzentrationen im Medium selbst unter Anwesenheit von Sauerstoff nur zu einem geringen Anteil genutzt. Viele Reaktionen der Glykolyse sind darüber hinaus reversibel und können auch in der Gluconeogenese in entgegengesetzter Richtung genutzt werden. Letzteres ist beim Wachstum auf C₂- oder C₃-Körpern der Fall. Dies dient der Bereitstellung von Glucose-6-phosphat für den Aufbau von Zellwandbestandteilen, zur Energiespeicherung und Stressschutz in Form von Glykogen und Trehalose (Abb. 1.1.2). Diese unterschiedlichen Anforderungen bedingen eine sorgfältige Regulation der Stoffflüsse in der Glykolyse, damit Hefezellen angemessen auf die äußeren Bedingungen wie z.B. Nährstoffangebot und O₂-Verfügbarkeit reagieren können. Dies beinhaltet verschiedene Regulationsmechanismen auf den Ebenen der Transkription, der Translation, sowie posttranslationaler Mechanismen, wie z.B. allosterische Regulation der Enzymaktivität und kovalente Modifikation der beteiligten Enzyme. Im Folgenden soll auf diese Mechanismen im Einzelnen eingegangen werden.

1.2.1 Transkriptionsregulation

Glucose ist die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die meisten Organismen. Entsprechend werden andere Kohlenstoffquellen wie Galaktose, Maltose, Saccharose und nicht vergärbare Stoffe wie Glycerin, Lactat und Ethanol nur dann verwertet, wenn keine Glucose im Medium vorhanden ist. Längerfristig wird diese Anpassung der Zellen durch die Hemmung der Transkription der kodierenden Gene erreicht, ein Phänomen, das allgemein als Glucoserepression bezeichnet wird. Ist die Glucose verbraucht, wird die Genexpression für die Verwertung anderer Kohlenstoffquellen zunächst dereprimiert, in vielen Fällen durch die alternativen Nährstoffe auch induziert. Die für die oben beschriebenen Glykolyseenzyme kodierenden Gene werden in *S. cerevisiae* weitgehend unabhängig von der zum Wachstum angebotenen Kohlenstoffquelle exprimiert. So konnten mit Hilfe von Promotor-*lacZ*-Fusionen etwa für die beiden Gene der Phosphofruktokinase (*PFK1* und *PFK2*) und für das der

Phosphoglyceratmutase (*GPMT*) maximal zweifache Unterschiede in der Transkription auf Glucosemedium im Vergleich zu nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen (Glycerin, Ethanol) festgestellt werden (Rodicio *et al.*, 1993; Heinisch *et al.*, 1991). Die höheren Transkriptionsaktivitäten wurden dabei jeweils auf Glucosemedien gemessen.

In den letzten Schritten der Glykolyse und bei der Umsetzung des Pyruvats zu Ethanol scheint dann allerdings die Transkriptionsregulation der beteiligten Gene eine bedeutendere Rolle zu spielen. So werden für die Pyruvatkinase auf Glucosemedium 6-20-fach höhere spezifische Enzymaktivitäten verzeichnet, als etwa bei Wachstum mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle (Hauf *et al.*, 2000). Auch das *PDC1*-Gen wird auf Glucosemedium deutlich stärker transkribiert als auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen (Seeboth *et al.*, 1990; Schmitt und Zimmermann, 1982). Bei den enzymatischen Reaktionen, bei denen verschiedene Isoenzyme die reversiblen Reaktionen katalysieren, scheinen die für die in Gärungsrichtung kodierenden Gene weitgehend konstitutiv exprimiert zu werden. Dies trifft sowohl auf *ENO2*, als auch auf *ADH1* zu. Andere Isoenzyme scheinen dagegen vorwiegend die Rückreaktion zu katalysieren und unterliegen entsprechend der Glucoserepression, d.h. sie werden mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle wesentlich stärker exprimiert (*ENO1*, *ADH2*).

Auch die Gene für die Enzyme der Hexosephosphorylierung unterliegen einer differentiellen Transkriptionsregulation. So wird *HXK2* in Gegenwart von Glucose exprimiert, bei Abwesenheit von Glucose jedoch reprimiert. Als negative Transkriptionsfaktoren wurden hier Rgt1 und Med8 identifiziert. Bei Disruption von *RGT1* erfolgt eine 18fach erhöhte Transkription von *HXK2* in Abwesenheit von Glucose (Palomino *et al.*, 2005). Außerdem wurde eine Beteiligung der Hexonikasen an der Glucoserepression festgestellt. Da aber *HXK1* und *GLK1* im Gegensatz zu *HXK2* durch Glucose selbst in der Transkription gehemmt werden, kommt *HXK2* eine besondere Rolle zu (Hohmann *et al.*, 1999). Dabei scheint das Protein selber eine geringere Rolle zu spielen als vielmehr sein Reaktionsprodukt Glucose-6-phosphat, für das eine gute inverse Korrelation zur Glucoserepression gefunden wurde (Ma *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1991). Der exakte molekulare Mechanismus der Verknüpfung von Hxk2 mit der Glucoserepression ist allerdings noch nicht geklärt.

Die Regulation der Genexpression beruht letztlich immer auf der Bindung mehr oder weniger spezifischer Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der betroffenen Gene, die entweder zu einer Aktivierung oder einer Hemmung der Transkription durch die RNA-Polymerase II bei Eukaryonten, zu denen auch *S. cerevisiae* zählt, führen. Diese Bindung erfolgt an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich. Bei Hefen spricht man im Falle einer Aktivierung von einer "UAS-Sequenz" ("upstream activating sequence"), im Falle einer hemmenden Wirkung

von einer "URS-Sequenz" ("upstream repressing sequence"). Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, wo diese Sequenzen relativ weit vom Transkriptionsstartpunkt des jeweiligen Genes entfernt liegen können, finden sich die entsprechenden Bereiche in Hefepromotoren in der Regel zwischen 400-700 bp im 5'-nichtkodierenden Bereich der Gene (Heinisch und Hollenberg, 1993).

Der erste Transkriptionsfaktor, der auf die Mehrzahl der Glykolysegene einwirkt, wurde in genetischen Untersuchungen identifiziert und als Gcr1 ("glycolysis regulator") bezeichnet. Mutanten mit Defekten im kodierenden Gen (*gcr1*) führen zu einer 3-20-fach reduzierten spezifischen Enzymaktivität (Clifton *et al.*, 1978). Entsprechend sind solche Mutanten nicht mehr in der Lage, auf Glucose zu wachsen und müssen auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerin und Ethanol angezogen werden. Zwei weitere Vertreter dieser Genfamilie, *GCR2* und *GCR3*, deren Produkte einen moderaten Einfluss auf die Regulation der Glykolysegene ausüben, wurden später isoliert (Uemura und Fraenkel, 1990; Uemura und Jigami, 1992). Für das Genprodukt von *GCR1* wurde eine Wechselwirkung am Promotor mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, der von *RAP1* (repressor/activator protein) kodiert wird, beschrieben (Baker, 1991). Dabei handelt es sich um ein Protein, das auch an die Promotoren von Genen der ribosomalen Proteine und an die Telomere der Chromosomenenden bindet und dort auch eine hemmende Wirkung entfalten kann (Yu *et al.*, 2003). Ähnliches gilt für das Genprodukt von *ABF1* (autonomously replicating sequence binding factor), ein Protein, das wie Rap1 auch an der Aktivierung und Repression der Transkription vieler Gene (einschließlich der Glykolysegene), am "gene-silencing", an der Rekombination und an der Telomerstruktur (Yarragudi *et al.*, 2004) beteiligt ist. Schließlich konnte auch noch das Genprodukt von *REB1* (RNA-Polymerase enhancer binding) als ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden (Morrow *et al.*, 1989). Reb1 ist ebenfalls ein Aktivator, der in der Aktivierung der Transkription durch Polymerase die RNA-Polymerase I mitwirkt und außerdem an der Transkriptions-Termination durch RNA-Polymerase II und an der Organisation von Nukleosomen beteiligt ist (Wang und Warner, 1998). Dieses Protein bindet z.B. in einer zweiten UAS des *PYK1*-Promotors und wechselwirkt wahrscheinlich mit den Faktoren, die an der ersten UAS gebunden sind (Boles, 1997).

In den letzten Jahren häufen sich darüber hinaus die Hinweise, dass einige Glykolyseenzyme nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern lokalisiert sind. Dies wurde zuerst für die Hexokinase PII beobachtet (Behlke *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2001). Kürzlich konnte auch für die Pyruvatdecarboxylase (Pdc) eine solche Lokalisation gezeigt werden (Hohmann, persönliche Mitteilung). Es wird vermutet, dass die Enzyme selbst als

Transkriptionsregulatoren wirken können und so eine Autoregulation der eigenen Genexpression erfolgt.

1.2.2 Translationskontrolle

Hinweise auf eine Kontrolle der Translation der mRNA glykolytischer Gene ergaben sich aus dem Versuch der Überproduktion der Pyruvatkinase. Hier wurde zunächst ein verlangsamtes Wachstum bei hoher Kopienzahl des in Hefezellen episomal eingebrachten *PYK1*-Gens beobachtet (Moore *et al.*, 1990a). Gleichzeitig konnte die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase nicht proportional zur Gendosis erhöht werden. Dies scheint hauptsächlich auf einer translationale Kontrolle zu beruhen, da bei einer Erhöhung der *PYK1*-spezifischen Transkriptmenge um mehr als das Doppelte des Wildtyp-Niveaus keine entsprechende Erhöhung der spezifischen Pyruvatkinase-Aktivität zu verzeichnen war. Anschließend Untersuchungen der Polysomenstruktur ergaben, dass bei zunehmender Transkriptmenge weniger Ribosomen pro mRNA-Molekül gebunden waren (Moore *et al.*, 1990c). Dies galt nicht nur für die *PYK1*-eigene mRNA, sondern auch für die von *PFK2*. Hier scheint also eine *in trans* wirkende Translationskontrolle vorzuliegen. Als *cis*-regulatorisches Element auf der *PYK1*-mRNA wurde ein Bereich von 27 Nukleotiden vor dem Translationsstartcodon identifiziert. Eine Deletion dieses Bereiches führte zum Verlust der Translationskontrolle und einer massiven Überproduktion der Pyruvatkinase. Auch die durch Überproduktion von *PYK1* vorher beobachtete Wachstumshemmung war in solchen Konstrukten aufgehoben (Moore *et al.*, 1990c). Nach Lage der Veröffentlichungen wurden diese Arbeiten in jüngerer Zeit leider nicht weiter verfolgt.

1.2.3 Posttranslationelle Regulationsmechanismen

Die Vorgänge der Transkription und Translation sind relativ zeit- und energieaufwändig und eignen sich daher eher für längerfristige Anpassungen der Zelle an die gegebenen Nährstoffbedingungen. Eine schnellere Umstellung des Stoffwechsels als direkte Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen erfordert dagegen die direkte Einflussnahme auf die Aktivität bereits gebildeter Enzyme. Auch hier sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe wirken.

1.2.3.1 Allosterische Regulation

Eine schnelle Reaktion auf die im Medium verfügbare Kohlenstoffquelle wird durch die Einwirkung niedermolekularer Moleküle auf die Enzymaktivität durch Bindung und Konformationsänderungen, d.h. durch allosterische Kontrolle, ermöglicht. Als Paradebeispiel

eines allosterisch regulierten Enzyms gilt die Phosphofruktokinase, deren Aktivität von einer Vielzahl von Effektoren beeinflusst wird (Sols, 1981; Kopperschläger und Heinisch, 1997). Obwohl ATP zusammen mit Fructose-6-phosphat ein Substrat des Enzyms darstellt, wirkt es in höheren Konzentrationen auch als allosterischer Inhibitor. Dieser Mechanismus wird als Rückkopplung aus dem Metabolismus angesehen, sodass bei genügend hoher intrazellulärer ATP-Konzentration (d.h. bei ausreichender Energieversorgung der Zelle), der Glykolysefluss gedrosselt werden kann. Umgekehrt wirkt AMP als allosterischer Aktivator. Der potenteste allosterische Aktivator der Pfk-Aktivität, Fructose-2,6-bisphosphat, wurde erst Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts entdeckt (van Schaftingen *et al.*, 1980). Er wird durch eine alternative Phosphofructo-2-kinase gebildet und wirkt bereits in mikromolaren Konzentrationen auf das Hefeenzym (Avigad, 1981). Es wird angenommen, dass die genannten Aktivatoren ihre Wirkung durch die Aufhebung der ATP-Hemmung entfalten (Rodicio *et al.*, 2000).

Aus formal biochemischen Erwägungen spielt die allosterische Kontrolle gerade der Pfk eine essentielle Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe. Da es sich bei der von der Pfk katalysierten Reaktion um einen irreversiblen Schritt handelt, wird in der Gluconeogenese für die Rückreaktion das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) benötigt, dessen Expression der Glucoserepression (s.o.) unterliegt. Hier wird allerdings anorganisches Phosphat bei der Bildung von Fructose-6-phosphat freigesetzt, d.h. das in der Pfk-Reaktion verbrauchte ATP wird nicht regeneriert. Eine gleichzeitige Aktivität beider Enzyme (Pfk und FBPase) bei plötzlicher Glucosegabe zu auf Ethanol wachsenden Zellen sollte also zu einem energieverbrauchenden Reaktionszyklus ("futile cycling") führen und für die Zelle letal sein (Navas *et al.*, 1993). Es wird angenommen, dass ein solcher Zyklus durch die gegenläufige allosterische Regulation der beiden Enzyme verhindert wird. So wirken die allosterischen Aktivatoren der Pfk, AMP und Fructose-2,6-bisphosphat, als Inhibitoren der FBPase-Aktivität, während ATP als Aktivator wirkt (van Schaftingen *et al.*, 1980; van Schaftingen und Hers, 1981; Yuan *et al.*, 1990)

Als weiterer zentraler allosterischer Kontrollmechanismus kann die Aktivierung der Pyruvatkinase durch Fructose-1,6-bisphosphat (d.h. das Produkt der Pfk-Reaktion) angesehen werden (Gancedo und Serrano, 1989). Da es sich hierbei um den zweiten glykolysespezifischen irreversiblen Schritt handelt, kann hierdurch der Fluss zum Pyruvat mit den aus dem oberen Teil der Glykolyse zur Verfügung stehenden Substraten koordiniert werden.

1.2.3.2 Kovalente Proteinmodifikation

Neben der allosterischen Regulation spielt auch die Phosphorylierung von Enzymen eine wichtige Rolle in der Kontrolle ihrer Aktivität. So bewirkt die Glucosezugabe zu auf Ethanol gewachsenen Hefezellen innerhalb von zwei Minuten eine Phosphorylierung der FBPase, die zu einer Senkung der spezifischen Enzymaktivität auf 40% des Ausgangswertes führt (Mazon *et al.*, 1982). Für die Hexokinase PII konnte eine Autophosphorylierung beschrieben werden (Rose *et al.*, 1991). Auch für die β -Untereinheiten der Phosphofruktokinase wurde eine Phosphorylierung beschrieben, deren Ursprung und physiologische Bedeutung allerdings noch unklar sind (Huse *et al.*, 1988).

1.2.3.3 Katabolit-Inaktivierung

Eine weitere zelluläre Anpassung an die Veränderungen der zum Wachstum angebotenen Kohlenstoffquellen stellt die Katabolit-Inaktivierung dar. Hierbei werden z.B. die Enzyme der Gluconeogenese proteolytisch abgebaut, wenn die Zellen von nicht vergärbaren Substraten auf Glucosemedium umgesetzt werden. Als Beispiel kann hier wieder die FBPase herangezogen werden, deren Aktivität nach der anfänglichen Phosphorylierung (s.o.) von 40% des Ausgangswertes über die folgenden drei Stunden nach Glucosezugabe kontinuierlich und irreversibel bis unter die Nachweisgrenze abnimmt (Holzer, 1976). Der proteolytische Abbau wird in diesem Fall durch Ubiquitinierung vermittelt (Schork *et al.*, 1995).

Die Katabolit-Inaktivierung greift aber nicht nur bei Enzymen der Gluconeogenese, sondern z.B. auch in der Verwertung von Disacchariden wie der Maltose. So konnte gezeigt werden, dass der Maltosetransporter nach Glucosezugabe zum Medium ebenfalls proteolytisch abgebaut wird, auch wenn sich die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen grundlegend von denen des FBPase-Abbaus unterscheiden (Riballo *et al.*, 1995). Der Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit kann im Einfluss der Katabolit-Inaktivierung auf die Zusammensetzung der Glucosetransporter in der Cytoplasmamembran gesehen werden (Krampe *et al.*, 1998; Lucero *et al.*, 2002).

1.3 Übergeordnete Regulationsnetzwerke

Interessanterweise stellt cAMP im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe, wie bei Bakterien, einen zentralen niedermolekularen Regulator dar. Während allerdings bei Prokaryonten, z.B. im *E. coli lac*-Operon, ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel die Abwesenheit von Glucose im Medium signalisiert, steigt bei *S. cerevisiae* der cAMP-Spiegel bei Glucosezugabe (Eraso und Gancedo, 1984) und führt zu einer Steigerung des Glykolyseflusses. Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass der erhöhte cAMP-

Spiegel in Hefe auf die Wirkung des cAMP/Ras-Weges zurückzuführen ist (Heinisch und Hollenberg, 1993). Neuere Arbeiten zeigen allerdings, dass das Glucosesignal eher über einen Sensor in der Cytoplasmamembran (Gpr1) wahrgenommen wird und über die Wirkung einer kleinen GTPase (Gpa2) zur Aktivierung der Adenylatcyclase führt, wodurch es zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt (Versele *et al.*, 1999). Die Aktivierung der Adenylatcyclase über das monomere Ras-Protein wird seither eher als Anpassung an den externen pH-Wert angesehen.

In jedem Fall bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) und führt so zur Freisetzung der aktiven katalytischen Untereinheiten (Thevelein und de Winde, 1999). Diese phosphorylieren eine Reihe von Zielproteinen, zu denen z.B. der Transkriptionsfaktor Adr1 zählt, der die Expression des *ADH2*-Gens steuert (Dombek *et al.*, 1993). Ein für den Glykolysefluss wichtiges Zielprotein der PKA ist die Phosphofructo-2-kinase, die durch die Phosphorylierung aktiviert wird und den allosterischen Aktivator Fructose-2,6-bisphosphat bildet (Heinisch und Hollenberg, 1993)).

Detaillierte Untersuchungen der Metabolitkonzentrationen in verschiedenen Glykolysemutanten und deren Einfluss auf die Induktion der Pyruvatkinase führten zu der Annahme, dass zur vollen Induktion eine kritische Konzentration der Triosephosphate im unteren Teil der Glykolyse zwar hilfreich, nicht aber absolut notwendig ist. Vielmehr wird vermutet, dass der gleichzeitige Anstieg von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, wie er in Phosphofructokinase-Mutanten auftritt, das eigentliche Signal für eine erhöhte Transkription des *PYK1*-Gens darstellt (Boles *et al.*, 1993; Boles und Zimmermann, 1993).

Ein weiterer Punkt einer allgemeinen Steuerung des Glykolyseflusses ist, dass *S. cerevisiae* über eine sehr geringe respiratorische Kapazität verfügt (Käppeli und Sonnleitner, 1986) und beim Wachstum auf Glucose die mitochondriale Biosynthese zum Teil der Glucoserepression unterliegt (Fiechter *et al.*, 1981; Käppeli und Sonnleitner, 1986). Bestätigt wird dies bei der kurzfristigen Umstellung des Stoffwechsels beim Überführen von Zellen, die auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen angezogen wurden, auf Glucose. Hier kommt es zu einer zunehmenden Anhäufung von Pyruvat und in der Folge zu einem verstärkten Fluss der Metabolite zum Ethanol (Pronk *et al.*, 1996).

1.4 Molekulargenetische Ansätze zur Steigerung der Ethanolproduktion

S. cerevisiae ist als eukaryontischer Modellorganismus genetisch gut definiert und leicht manipulierbar. Die frühzeitige Klonierung sämtlicher Glykolysegene führte darum bald zu Versuchen, eine Steigerung des Glucoseumsatzes zu erreichen. Als erstes wurde die Überproduktion der für die Glykolyse spezifischen irreversiblen Schritte der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase untersucht. Dabei wurde weder für Pfk alleine (Heinisch, 1986b), noch für Pfk und Pyk (Schaaff *et al.*, 1989) eine erhöhte Ethanolbildungsrate beobachtet. Die Überproduktion von Pfk, Hxk und Pgi (Rosenzweig, 1992) hatte weder auf das Wachstum, noch auf die Vitalität der Zellen einen Einfluss, erst bei Überproduktion von Pyruvatkinase konnte eine deutlich verringerte Zellvitalität festgestellt werden, was die Schlussfolgerungen von Boles unterstützt (Boles, 1997), denen zufolge die Pyruvatkinase an der Koordination des Zellzyklus beteiligt sein könnte. In Untersuchungen zur Überproduktion der Pyruvatdecarboxylase wurde festgestellt (van Hoek *et al.*, 1998), dass auch in Chemostatkulturen keine Erhöhung des Glykolyseflusses zu erreichen war, was frühere Ergebnisse für Batchkulturen bestätigt (Schaaff *et al.*, 1989).

1.5 Mathematische Modellierung des Glucoseabbaus durch Hefe

Schon lange wird diskutiert, wie die biochemisch beschriebenen katabolischen und anabolischen Wege reguliert werden. Die Entdeckung, dass die zwei für die Glykolyse spezifischen irreversiblen Schritte, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase, gleichzeitig auch durch eine Reihe von niedermolekularen Effektoren beeinflusst werden können, führte zu der Annahme, dass die Regulierung des Flusses über eine allosterische Kontrolle erfolgt (Hess und Boiteux, 1971). Versuche der Überproduktion von Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase führten weder einzeln noch in Kombination zu einer Erhöhung des Glykolyseflusses. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Enzymmenge nicht der limitierende Faktor ist (Schaaff *et al.*, 1989). Die Tatsache, dass Hefezellen, die aufgrund eines Defektes in einem der beiden *PFK*-Gene keine nachweisbare Enzymaktivität mehr zeigten und trotzdem Glucose vergären konnte, spricht ebenfalls gegen eine besondere Stellung der Phosphofruktokinase als limitierenden Faktor in der Glykolyse (Heinisch und Hollenberg, 1993). Dieser klassische Ansatz mit einzelnen geschwindigkeitsbestimmenden Schritten eines physiologischen Weges wurde von Kacser und Kollegen verlassen und sie entwarfen das Modell der "Metabolic Control Analysis" (Kacser und Burns, 1973). Dabei betrachten die Autoren die Abhängigkeit des Flusses durch einen physiologischen Weg von

jedem einzelnen Teilschritt. Die MCA hat bis heute Bestand und wurde ständig weiterentwickelt und auch schon in unterschiedlichen Untersuchungen angewendet, was zur Veröffentlichung einer erweiterten Version der Theorie führte (Kacser *et al.*, 1995). Bei dieser Theorie wird jedem Enzym eines physiologischen Weges ein Kontroll-Koeffizient

zugeordnet. Dieser ist definiert als $C_{E_i}^J = \left(\frac{\partial J / J}{\partial v_{E_i} / v_{E_i}} \right) = \left(\frac{\partial \ln J}{\partial \ln v_{E_i}} \right)$

(J = Fluss, v_{E_i} = Rate des Enzyms i). Ein zweiter Faktor ist die Elastizität ("Controllability Coefficient" oder auch "elasticity" genannt), die den Einfluss von Metaboliten und Effektoren

auf die Enzymaktivität angibt durch $\varepsilon_p^v = \left(\frac{\partial v_{E_i} / v_{E_i}}{\partial P / P} \right) = \left(\frac{\partial \ln v_{E_i}}{\partial \ln P} \right)$

(v = Rate des Enzyms i, P = betrachteter Einfluss-Parameter). Unter dem Begriff Elastizität können auch die Mengen der jeweiligen Enzyme betrachtet werden, denn eine z.B. 1%ige Erhöhung einer Enzymaktivität entspricht 1% mehr Enzym. Somit ist die Elastizität das Ausmaß, in dem ein Effektor oder die Enzymmenge Einfluss auf den Gesamtfluss J nehmen kann. Der Kontroll-Koeffizient ist bei der Betrachtung der Enzymmenge demnach

beschreibbar durch: $\frac{dJ / J}{d\varepsilon_i / \varepsilon_i} = C_i^J$ (J = Fluss, ε_i = Elastizität des Enzyms i). Annähernd gilt

dies auch bei der Betrachtung nicht infinitesimaler, sondern nur sehr kleiner Änderungen. Dann gilt unter der Annahme konstanter Bedingungen (Konzentrationen des Enzyms und der

Effektoren) in der Zelle: $\frac{\partial J / J}{\partial \varepsilon_i / \varepsilon_i} \approx C_i^J$.

Bei einem sehr großen Einfluss der Elastizität auf den Fluss nähert sich der Quotient und damit der Kontroll-Koeffizient dem Wert 1. Mit anderen Worten würde ein solches Enzym den flussbestimmenden Schritt ("bottleneck") in einem Stoffwechselweg darstellen. In den meisten Untersuchungen wurden für $C_{E_i}^J$ bisher immer sehr niedrige Werte gefunden (Kacser *et al.*, 1995). Eine Gesamtbeschreibung der Kontrolle des Flusses durch einen physiologischen Weg ist über das "flux summation theorem" (Kacser und Burns, 1973) möglich. Demnach können alle Kontroll-Koeffizienten aufsummiert werden zu einem

gesamten Kontroll-Koeffizient: $\sum_{i=1}^n C_{E_i}^J = 1$ (n= Anzahl der Enzyme des physiologischen

Weges, E_i die einzelnen Enzyme, $C_{E_i}^J$ der Kontroll-Koeffizient des Enzyms i, und J der Fluss). Ein zweites Theorem geht davon aus, dass bei gleichzeitiger Veränderung der Aktivität aller Enzyme durch die Enzymmenge ($\Delta E_i / E_i$) um den selben Faktor r sich auch der

Fluss ($\Delta J/J$) um den Faktor r ändert, also $\frac{\Delta J/J}{\Delta E_i/E_i} = 1$ oder $\Delta J/J = \Delta E_i/E_i$. Dies ist das so genannte "co-ordinate theorem".

Bei der Untersuchung des Syntheseweges von Tryptophan wurden die Kontroll-Koeffizienten für jedes beteiligte Enzym ermittelt (Niederberger *et al.*, 1992), indem die Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der Enzymaktivität *in vitro* untersucht und die Steigung $\frac{\partial \mu / \mu}{\partial v / v} = C_{E_i}^J$ (μ = Wachstumsrate, v = Enzymaktivität) bestimmt wurde, wobei davon ausgegangen wurde, dass μ dem Fluss J proportional ist. Die fünf betrachteten Enzyme ergaben Werte für $C_{E_i}^J$ von 0,018, 0,174, 0,013, 0,013 und 0,040. Der gesamte Einfluss dieser Gruppe von 5 Enzymen auf den Fluss der Tryptophanbildung beträgt also in Summe 0,258, gegenüber einer 100%igen Kontrolle bleibt also ein Rest von 0,742, der beliebig auf das angeschlossene Stoffwechselnetzwerk verteilt sein kann und somit rechnerisch zu $\frac{3}{4}$ zum Fluss beiträgt. In Überproduktionsversuchen (Niederberger *et al.*, 1992) wurde gezeigt, dass die Änderung des Flusses jedoch nicht den addierten Einflüssen entsprach, sondern mit dem Faktor 8,8 deutlich über dem erwarteten Faktor 2 lagen. Bei Betrachtung mit dem "co-ordinate theorem" sollte die Produktion aufgrund der mittleren Überproduktionsfaktoren der beteiligten Enzyme von 24 also ebenfalls bei 24 liegen. Mit dem Faktor 8,8 wurde also nur $\frac{1}{3}$ des vorhergesagten Wertes erreicht. Als Ursache für die geringe Übereinstimmung mit beiden Theoremen in ihren Untersuchungen diskutierten die Autoren, dass die Enzyme eines Stoffwechselweges durch die Verknüpfung mit anderen physiologischen Wegen in ihrer Aktivität abhängig sind. Jedoch bleibt festzuhalten, dass in diesem Beispiel die Überproduktion einer Gruppe von Enzymen eines Stoffwechselweges zu einer fast neunfachen Erhöhung des Flusses führte.

Für die Betrachtung der Glykolyse als zentralem Weg im Energiestoffwechsel wurden, wie oben beschrieben, bereits eingehende Untersuchungen zur Überproduktion einzelner Enzyme durchgeführt (Schaaff *et al.*, 1989), jedoch noch keine Überproduktion aller Glykolyseenzyme gleichzeitig untersucht. Vor dem Hintergrund, dass durch die Überproduktion aller spezifischen Enzyme für die Tryptophan-Biosynthese ein erhöhter Fluss gemessen werden konnte (Niederberger *et al.*, 1992), sollte dies in der vorliegenden Arbeit für die Glykolyse ebenfalls versucht werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Überproduktion aller am Glucoseumsatz beteiligten Enzyme in einem Hefestamm zu erreichen, um die Auswirkungen auf dessen Wachstum und

Alkoholbildung zu untersuchen. Als der zentrale Weg der Glucoseverwertung in *S. cerevisiae* ist die Glykolyse in den angeführten Aspekten von herausragender Bedeutung. Veränderungen im Wachstums- und Gärverhalten sind in solchen Überproduzenten deshalb zu erwarten und sollten in dieser Arbeit eingehend untersucht werden.

Von besonderem Interesse war der Einsatz von Vektoren mit hoher Kopienzahl in Hefe, die sich gleichzeitig in großen Mengen aus *E. coli* isolieren lassen (Hill *et al.*, 1986). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie in Hefezellen in 20-40 Kopien pro Zelle vorliegen, womit die Gendosis der eingesetzten Glykolysegene entsprechend ansteigt. Zur Selektion der Plasmide *in vivo* wurden hier zwei Vektoren genutzt, die unterschiedliche Auxotrophien in den Rezeptorstämmen (*ura3* bzw. *leu2*) komplementieren. Diese Strategie wurde verfolgt, da die Insertion von 14 Genen in einen Vektor zu einer Plasmidgröße über 50 kbp geführt hätte, was eine Amplifikation der DNA in *E. coli* wesentlich erschwert hätte. Die Transformation von Hefezellen mit diesen Vektoren kann effizient und schnell mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden (Ito *et al.*, 1983; Klebe *et al.*, 1983), so dass ein problemloses Einbringen von DNA auch für Plasmide der erwarteten Größe um 25 kb möglich ist. Eine weitere in der vorliegenden Arbeit genutzte Eigenschaft der Hefe ist ihre ausgeprägte Fähigkeit zur homologen Rekombination, womit neue Fragmente mit geringen Bereichen an homologen flankierenden Sequenzen in einen Vektor durch *in vivo*-Rekombination inseriert werden können (Oldenburg *et al.*, 1997). So sollten zunächst schrittweise alle an der alkoholischen Gärung beteiligten Gene in die beiden Vektoren YEp351 und YEp352 eingesetzt werden. Die Arbeit lässt sich somit in zwei Schwerpunkte gliedern. Der erste Teil umfasst die Konstruktion der benötigten Glykolyseplasmide sowie eines Rezipientenstammes (Abschnitte 3.1, 3.2 und 3.3). Im zweiten Teil sollten anschließend die Auswirkungen der Überproduktion der verschiedenen Enzyme auf das Wachstum und die Ethanolbildung untersucht werden (Abschnitte 3.4 und 3.5).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Escherichia coli* K12-Stamm und Nährmedien

DH5 α F': F'(Φ80dlacZΔM15)Δ(LacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 r_K⁻ m_K⁺ supE44 thi-1 gyrA relA1 (GibcoBRL, Gaithersburg MD, USA)

Vollmedium (LB)

0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 0,5% NaCl

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 50mg/l Ampicillin oder 25mg/ml Kanamycin zugesetzt. Für die Verwendung von festen Nährböden wurde 1,5% Agar zugefügt.

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme und Nährmedien

Tab. 2.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp/Kommentar/Beschreibung	Herkunft
CEN.PK111-61A K39	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3Δ1 trp1-289 MAL2-8^c SUC2 GAL</i>	J.J.Heinisch
CEN.PK102-3A K18	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3Δ1 trp1-289 MAL2-8^c SUC2 GAL</i>	J.J.Heinisch
VWH1B	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3Δ1 trp1-289 MAL2-8^c SUC2 GAL pfk1::HIS3</i> , "template" für <i>ADH1</i>	J.J.Heinisch
Y23336 Δpgi	BY4743 <i>MATα/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 YDR196c::kanMX/ YDR196c, pgi1-Deletion</i> , "template" für <i>TPII</i>	SRD-biotec, Frankfurt a.M.
MCH-7B	<i>MATα ura3-52 leu2-3112 his3-11,15 SUC MAL GAL</i> , "template" für <i>TDH2</i> in pMHE8-2	J.J.Heinisch
EBY.VW4000	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ hxt13::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP gal2Δ stl1Δ::loxP agt1::loxP ydl247wΔ::loxP yjr160cΔ::loxP</i>	E.Boles
Uvaferm CGC62	Universalhefe für Weiß- und Rotweine mit hoher Fruchtsterbildung und für reduzierte Methanolentwicklung in Obstmaischen	Begerow, Langenlohnshiem

SIHA Aktiv-Hefe 6	Brennereihefe für Obst-, Getreide und Topinamburmaischen	Begerow, Langenlohnshheim
VWH3B 614	<i>MATα ura3-52 his3 trp1-289 leu2-3,112 MAL2-8^c SUC2 GAL pyk1::HIS3</i>	J.J.Heinisch
VWH3A 615	<i>MATα ura3-52 his3 trp1-289 leu2-3,112 MAL2-8^c SUC2 GAL pyk1::HIS3</i>	J.J.Heinisch
MDH2	<i>MATα/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2-3,112/leu2Δ0 ura3-52/ ura3Δ0 trp1-289/TRP1 MET15/met15Δ0 MAL2-8^c SUC2 GAL pyk1::HIS3/pyk1::HIS3 pgi1::kanMX/PGII pMHE6, pMHE22</i>	M.Emili/ J.J.Heinisch
LD3R-7B	<i>MATα leu1 SUC3 mal0</i>	J.J. Heinisch
SMC-19A	<i>MATα leu1 MAL2-8c MAL3 SUC3</i>	J.J. Heinisch

Vollmedium (YEP)

Bacto-Pepton (Difco) 2%, Hefeextrakt (Difco) 1%, Kohlenstoffquellen: Glucose 2%, Maltose 2%, Glycerin/Ethanol 2%/3%. Die Zucker wurden separat autoklaviert und nach Abkühlung zugegeben. Ethanol wurde dem autoklavierten Medium nach Abkühlung zugegeben. Die Zugabe von Geneticin (G418, 200 mg/l) erfolgte nach Abkühlung des Mediums auf <50°C.

Synthetisches Medium mit Zusätzen (SC)

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 0,67%, Aminosäure/Nukleobasen-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration, pH6,2. Konzentrationen der Aminosäure/Nukleobasen-Lösung nach (Sherman *et al.*, 1983). Für Uracil und Leucin wurden 20mg/l Endkonzentration eingestellt. Glucose 2%, Maltose 2%, Glycerin/Ethanol 2%/3%. Die Zucker wurden separat autoklaviert und nach Abkühlung zugegeben. Ethanol wurde dem autoklavierten Medium nach Abkühlung zugegeben. Die Zugabe von Geneticin (G418, 200 mg/l) erfolgte nach Abkühlung des Mediums auf <50°C. Zur Selektion wurde auf die jeweiligen Zusätze (Uracil, Leucin) verzichtet. Die Bezeichnung dieser Medien ist dann z.B. für die Selektion auf Uracil-freiem Medium SC_{ura} oder SC_{ura/leu} für die Selektion auf beide Marker.

Synthetisches Minimalmedium (SM)

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 0,67%, pH6,0, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Menge. Glucose 2%, Maltose 2%, Glycerin/Ethanol 2%/3%

Sporulationsmedium (KAc)

Kalium-Acetat 1%, Agar 2%, pH5,5. Bei Sporulation von auxotrophen Diploiden wurden die entsprechenden Zusätze in ¼ der in SC-Medien verwendeten Konzentrationen zugegeben.

Getreidemaische:

80g Malzschrot (0,5mm Sieb) und 300ml Leitungswasser wurden klumpenfrei gemischt und der pH-Wert mit 1N H₂SO₄ auf 6,0-6,5 eingestellt. Die Maische wurde nach Zugabe von Verflüssigungsenzym Lyquozym (Novozymes) nach Angabe des Herstellers unter ständigem Rühren im Maischeapparat 30min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf 52°C und Einstellung des pH-Wertes auf 5,0-5,2 wurden der Maische die Verzuckerungsenzyme SAN-Super und Gammaclast (Novozymes) nach Angabe des Herstellers zugefügt und 30 min inkubiert. Nach Abkühlung auf 30°C wurde Kalium-Sulfit (Endkonzentration 0,04g/ml) zugegeben und auf 500ml mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Maische wurde filtriert und bei Bedarf bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide**Tab. 2.1.3.1** Plasmidkonstruktionen

Name	Gene	Herkunft	Kommentar
pJJH542	<i>bla URA3 HXK2 PFK1 PFK2</i>	J.J.Heinisch	Ausgangsvektor für pMHE1
pJJH543	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1</i>	J.J.Heinisch	Ausgangsvektor für pMHE2
pMHE1	<i>bla URA3 HXK2 PFK1 PFK2</i>	diese Arbeit	<i>HXK2</i> ersetzt in pJJH542
pMHE2	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1 PDC1</i>	diese Arbeit	<i>PDC1</i> in pJJH543
pMHE3	<i>bla URA3 HXK2 PFK1 PFK2 ADH1</i>	diese Arbeit	<i>ADH1</i> in pMHE1
pMHE4	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1 PDC1 PGK1</i>	diese Arbeit	<i>PGK1</i> in pMHE2
pMHE5	<i>bla URA3 HXK2 PFK1 PFK2 ADH1 PGII</i>	diese Arbeit	<i>PGII</i> in pMHE3
pMHE6	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1 PDC1 PGK1 ENO2</i>	diese Arbeit	<i>ENO2</i> in pMHE4
pMHE7	<i>bla URA3 HXK2 PFK1 PFK2 ADH1 PGII TP11</i>	diese Arbeit	<i>TP11</i> in pMHE5
pMHE8-1	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1 PDC1 PGK1 ENO2 TDH1</i>	diese Arbeit	<i>TDH1</i> in pMHE6
pMHE8-2	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1, PYK1 PDC1 PGK1 ENO2 TDH2</i>	diese Arbeit	<i>TDH2</i> in pMHE6

pMHE8-3	<i>bla LEU2 ADH1promHXT1 FBA1 GPM1 PYK1 PDC1 PGK1 ENO2 TDH2</i>	diese Arbeit	sequenziertes <i>TDH2</i> über pMHE11 in pMHE6 kloniert
pMHE11	<i>kanMX lacZ TDH2</i>	diese Arbeit	zur Sequenzierung von <i>TDH2</i>
pMHE30	<i>kanMX lacZ' ADH1promHXT1</i> (Teil von <i>ADH1prom</i> fehlt)	diese Arbeit	zur Sequenzierung von <i>HXT1</i>
pMHE40	<i>kanMX lacZ'::PFK1_{atp}</i>	diese Arbeit	zur Sequenzierung von <i>PFK1_{atp}</i>
pMHE41	<i>kanMX lacZ'::PFK1_{atp}</i>	diese Arbeit	pMHE40 verkürzt durch <i>BamHI/BglII</i> , zur Sequenzierung von <i>PFK1_{atp}</i>
pMHE22	<i>bla URA3 HXK2 PFK1_{atp} kanMX PFK2 ADH1 PGII TPII</i>	D.Palgunow	pMHE7 mit <i>PFK1_{atp}</i> und <i>kanMX</i> statt <i>PFK1</i>

Tab. 2.1.3.2 Plasmide und Plasmidkonstrukte aus Vorarbeiten zu den Glykolyseplasmiden

Name	Gene	Herkunft	Beschreibung
YEp351	<i>bla lacZ' LEU2</i>	(Hill <i>et al.</i> , 1986)	Ausgangsvektor für Glykolyseplasmide mit <i>LEU2</i> -Marker, Kontrolle bei physiologischen Untersuchungen
YEp352	<i>bla lacZ' URA3</i>	(Hill <i>et al.</i> , 1986)	Ausgangsvektor für Glykolyseplasmide mit <i>URA3</i> -Marker, Kontrolle bei physiologischen Untersuchungen
pUK21	<i>kanMX lacZ'</i>	(Vieira und Messing, 1991)	Konstruktion von pMHE11 zur Sequenzierung von <i>TDH2</i>
pUK1921	<i>kanMX lacZ'</i>	(Heinisch, 1993)	Konstruktion pMHE30 zur Sequenzierung von <i>ADH1promHXT1</i>
pJJH82	<i>kanMX, lacZ, GPM1</i>	J.J.Heinisch	<i>GPM1</i> ursprünglich aus Genbank isoliert und als <i>BglII/SalI</i> in pUK21 eingesetzt
pJJH84	<i>bla, lacZ, FBA1,</i>	J.J.Heinisch	Klon aus Umklonierung des <i>Asp718/BamHI</i> -Fragmentes aus pHGS101 (Entian), der ursprünglich aus Genbank isoliertes <i>FBA1</i> enthält, in pUC21 <i>Asp718</i> resp. <i>KpnI</i>
pJJH85	<i>bla, lacZ, PYK1,</i>	J.J.Heinisch	<u>PCR</u> mit Oligonukleotiden pPYK5' <u>CCCGGATCCGTCGGCTTGTGATAC</u> (<i>BamHI</i>) pPYK3' <u>GAAGCTGATCATAGTTCGCTGGC</u> (<i>BclI</i>). "template" war <i>PYK1</i> -Klon von J.J.Heinisch, PCR-Produkt als <i>BamHI/BclI</i> -Fragment in pUC21 <i>BamHI</i> ligiert
pJJH87	<i>bla lacZ' PDC1</i>	J.J.Heinisch	"template" für <i>PDC1</i>

pJJH531	<i>bla, lacZ, ADH1promHXT1</i>	J.J.Heinisch	<i>ADH1p-HXT</i> -Konstrukt umklontiert aus pFMHXT1A (Boles) als <i>BamHI/HindIII</i> in pUC18
pOGG21r	<i>bla, lacZ', LEU2, FBA1</i>	J.J.Heinisch	<i>FBA1</i> ursprünglich aus Genbank isoliert und über pJJH84 als <i>BamHI/SphI</i> -Fragment in YEp351 <i>BamHI/SphI</i> ligiert
pOGG22	<i>bla, lacZ', LEU2, FBA1, GPMT</i>	J.J.Heinisch	<i>GPMT</i> ursprünglich aus Genbank isoliert und über pJJH82 als <i>BamHI/Bg/II</i> -Fragment in pOGG21r <i>BamHI</i> ligiert
pOGG23r	<i>bla, lacZ', LEU2, FBA1, GPMT, PYK1</i>	J.J.Heinisch	<i>BamHI/Bg/II</i> Fragment aus pJJH85 (<i>PYK1</i>) ligiert mit pOGG22 <i>BamHI</i>
pJJH543	<i>bla, lacZ', LEU2, FBA1, GPMT, PYK1, ADH1promHXT1</i>	J.J.Heinisch	<u>PCR</u> -Produkt aus pJJH531 (<i>ADH1p-HXT</i>) mit M13reverse und <i>PYK-HXT1</i> end cotransformiert in pOGG23r <i>BamHI</i>
pJJH389u	<i>bla, lacZ, PFK2</i>	(Arvanitidis und Heinisch, 1994)	<i>PFK2</i> in pUC19 als <i>BamHI</i> -Fragment
pOGG2-1	<i>bla, lacZ', URA3, PFK2Prom-150</i>	J.J.Heinisch	<i>PFK2</i> ursprünglich aus Genbank isoliert und als <i>BamHI/SphI</i> -Fragment in YEp352 eingesetzt, Promotor unvollständig nur bis ca.-150
pOGG2-2	<i>bla, lacZ', URA3, PFK2Prom-150, PFK1</i>	J.J.Heinisch	<i>PFK1</i> ursprünglich aus Genbank isoliert und als <i>SphI</i> -Fragment in pOGG2-1 eingesetzt
pJJH536	<i>bla, lacZ', URA3, PFK2, PFK1</i>	J.J.Heinisch	Unvollständiger Promotor von <i>PFK2</i> in pOGG2-2 ersetzt durch Ligation des 1,1kb-Fragment aus pJJH389u <i>SpeI/PvuII</i> in pOGG2-2 <i>SpeI/PvuII</i>
pJJH542	<i>bla, lacZ', URA3, PFK2, PFK1, HXK2</i>	J.J.Heinisch	<u>PCR</u> -Produkt aus pMR177 (Entian) mit M13reverse und <i>PFK2r-HXK2</i> start (Heinisch), cotransformiert mit pJJH536 <i>BamHI</i>
pJJH769u	<i>bla, HIS3, PFK1_{atp}</i>	(Rodicio <i>et al.</i> , 2000)	<i>PFK1_{atp}</i> als <i>SphI</i> -Fragment in pT7T3, das <i>HIS3</i> als <i>BamHI</i> -Fragment enthält
pJJH13	<i>bla, ACT1</i>	J.J.Heinisch	<i>ACT1</i> als Standard zur "Real-Time"-RT-PCR

Tab. 2.1.3.3 Liste der Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
HXK2ÜP1	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACAC AGGAAACAGCTATGGCGTCTGGGATTATTTCGAATACTG	Teilsequenz von <i>HXK2</i> und von pJJH536
HXK2ÜP2	GTGTGGCAGTTACTATATATTAGTAGGATATTCGATCTATA TATAGATGGTAGGTGTAGAGAGGGTTAAAATTGG	Teilsequenz von <i>HXK2</i> und von pJJH536

PDC1endADHpc	GGAAACAACAAAAGGATATCCGAAATATTCCACGGTTTAG AAAAAATGGATCCGGTCTTCCATGGTAAGTGACAGTG	Teilsequenz von <i>PDC1</i> und von pJH543 mit <i>Bam</i> HI
pMHE1ADH3'	CCTACCATCTATATATAGATCGAATATCTACTAATATATA GTAACCTGGATCCTGACCTACAGGAAAGAGTTACTC	Teilsequenz von <i>ADH1</i> und von pMHE1 mit <i>Bam</i> HI
pMHE1ADH5'	CCTCTTACCCAGATTTACCCCACTTTATCTTAATCTTCGTT TCCACCCCTCCGCGCTCTTTTCC	Teilsequenz von <i>ADH1</i> und von pMHE1
PGK-pMHE2.1	AACAAAAGGATATCCGAAATATTCCACGGTTTAGAAAAA ATGGATCCATTTAAAGATGCCGATTTGGGCGCG	Teilsequenz von <i>PGK1</i> und von pMHE2 mit <i>Bam</i> HI
PGK-pMHE2.3	GTAACGAAAAATAAATTGGTTCATATTACTGCACTGTC ACTTACCATCATAAAGGCATTAAGAGGAGCG	Teilsequenz von <i>PGK1</i> und von pMHE2
mcpgi5'	CGAAAATCTTATTCTTGAGTAACCTTTCTGTAGGTCAG GGATCCATGCGGCATTTCTGGCGGC	Teilsequenz von <i>PGI1</i> und von pMHE3 mit <i>Bam</i> HI
mcpgi3'	CCCTCTACACCTACCATCTATATAGATCGAATATCT ACGCGACACAATAAAGTCTTAC	Teilsequenz von <i>PGI1</i> und von pMHE3
mcENO5'	GTATGAGGGTGAAGCCAAAATAAAGGATTTCGCGCCCAAAT CGGATCCGGCTATCGTACAAACAATGGCGG	Teilsequenz von <i>ENO2</i> und von pMHE4 mit <i>Bam</i> HI
mcENO3'	GGAAACAACAAAAGGATATCCGAAATATTCCACGGTTTAG AAAGCAATAGACAGCAGAGTCTTTG	Teilsequenz von <i>ENO2</i> und von pMHE4
mcTPIstart	GAACATTGCCACTTACATAGCGATGCAAATAGCCGCCAGG AAATGCCGCGGATCCGGCAAGAGAGAAGACCCAGAG	Teilsequenz von <i>TPI1</i> und von pMHE5 mit <i>Bam</i> HI
mcTPIend	GTTATAAAAAATAAAGTGTATACAAATTTAAAGTGACT CTTAGGGCGCCTTGCTTTTTGTGTATC	Teilsequenz von <i>TPI1</i> und von pMHE5
mcTDH1start	GTATGAGGGTGAAGCCAAAATAAAGGATTTCGCGCCCGGAT CCGGGCCAGACTAATGGGAGGAG	Teilsequenz von <i>TDH1</i> und von pMHE6 mit <i>Bam</i> HI
mcTDH1end	CCAACATCTTCTGACCGCCATTGTTGTACGATAGCCCCG CCGACGTTCTCGCCATAAC	Teilsequenz von <i>TDH1</i> und von pMHE6
mcTDH2prom	CCCTGATAATAGTATGAGGGTGAAGCCAAAATAAAGGATT CGCGCCCGGATCCAGTTCAAGATCTTTAATGTCC	Teilsequenz von <i>TDH2</i> und von pMHE6 mit <i>Bam</i> HI
mcTDH2term	CTTGTAACCAACATCTTCTGACCGCCATTGTTGTACGA TAGCCCAAATACTACAGCATCTC	Teilsequenz von <i>TDH2</i> und von pMHE6
TDH2vor	GGAGAATATGCTGAATACTTGG	Teilsequenz <i>TDH2</i> für <i>Bg</i> III/ <i>Bg</i> III-Ligation in pUK21
TDH2nachBg	GGCGAGATCTTCAGGTTATGTTACTATAGG	Teilsequenz <i>TDH2</i> für <i>Bg</i> III/ <i>Bg</i> III-Ligation in pUK21
M13forward	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Universal forward
M13reverse	CAGGAAACAGCTATGACCATG	Universal reverse, Sequenzierung <i>HXT1</i>
HXT1seq1	GGTAACATGAAACCAAGGTG	Sequenzierung <i>HXT1</i>
HXT1seq2	GGTAGAATTATCTCTGGTTTAGG	Sequenzierung <i>HXT1</i>
HXT1seq3	GGTACCATTGTTTTCCAGGCTGTCCG	Sequenzierung <i>HXT1</i>

HXT1seq4	GCCGGTGAAGGTCAAGAAGCTAG	Sequenzierung <i>HXT1</i>
TDH2RT1	CCACTGTTCACTCCATGACCGCC	RT-PCR
TDH2RT2	CCCAAGACACCCTTCAACTTACC	RT-PCR
PGIrev	GGTATACTGGAGGCTTCATGAGTTATG	Nachweis <i>Δpgi1</i>
PGIfor	GGTCCGCTTTCACGTATTTGGATG	Nachweis <i>Δpgi1</i>
PYKrev	GGCCAGAAGCTGAACATAGTTCCTGG	Nachweis <i>Δpyk1</i>
PYKfor	GTGTGTCAATGCTACTATTTTGGAG	Nachweis <i>Δpyk1</i>
MHE6HXTfor	GGGTTCCAGTATCCAAGAGAGG	Nachweis pMHE6
MHE6GPMfor	GGTATTCCATTGGTCTTCGAATTGG	Nachweis pMHE6
MHE22HXT2for	GGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTG	Nachweis pMHE22
MHE22TPIrev	GGGTAGCACGGTCCTCAGGACG	Nachweis pMHE22
PFK1Bglatp	GATCTGTTGCTTCAGAAGATTGGG	Konstruktion pMHE22
PFK1atpMHE7	GGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA GCT GCGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Konstruktion pMHE22
ActRT3	GGTATTGTCACCAACTGGGACGATATGG	RT-PCR
ActRT4	GCTTGATGGAAACGTAGAAGGCTGG	RT-PCR
HXTrt3	GTTAATTGTTGTAGAGATTGAATCATG	RT-PCR
HXTrt5	GGTTGAAGCTGGCAGAATCGACG	RT-PCR

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (München) synthetisiert.

2.1.4 Restriktionsenzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.5 Lösungen für Enzymtests, DNA- und RNA-Arbeiten

Phosphat-Puffer

Kaliumphosphat-Puffer wurde als 1M Stammlösung angesetzt. Dazu wurden 1M Lösungen von K_2HPO_4 und KH_2PO_4 hergestellt und der pH-Wert durch Mischen auf 7,0 eingestellt. Zur Herstellung von 50mM Phosphat-Puffer wurde entsprechend mit Wasser verdünnt. Zur Herstellung von Testlösungen für die Enzymmessungen wurden die jeweiligen Zusätze aus Stammlösungen beigegeben.

Imidazol-Puffer

Imidazol-Puffer wurde als 0,5M Stammlösung angesetzt. Dazu wurde eine 0,5M Lösung von 1,3-Diaza-2,4-Cyclopentadien ($C_3H_4N_2$) hergestellt und mit HCl auf pH 7,0 eingestellt. Zur Herstellung von 50mM Imidazol-Puffer wurde entsprechend mit Wasser verdünnt. Zur Herstellung von Testlösungen für die Enzymmessungen wurden die jeweiligen Zusätze aus Stammlösungen beigegeben.

Citrat-Puffer

Citrat-Puffer wurde als 0,5M Stammlösung angesetzt. Dazu wurde Na-Citrat in Wasser gelöst und mit Zitronensäure auf pH 7,0 eingestellt.

Natriumpyrophosphat-Puffer

Natriumpyrophosphat-Puffer wurde als 0,171M Lösung angesetzt und für den Enzymtest für Alkohol-Dehydrogenase entsprechend den Angaben verdünnt.

Sphäroplasten-Puffer

Sphäroplasten-Puffer wurde aus Sorbitol (0,9M) und EDTA (0,1M) hergestellt (pH6-8) und autoklaviert. Kurz vor Gebrauch wurde DTT in einer Endkonzentration von 0,02M zugegeben.

TE-Puffer

TE-Puffer wurde aus 1M Stammlösung von Tris-HCl und 100mM Stammlösung von EDTA (Ethylendiamintetraacetat) auf 10mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1mM EDTA eingestellt.

2.1.6 Lösungen für "Mini-Plasmid-Isolierungen"

Die angegebenen Lösungen gehen aus den Zusammensetzungen der Lösungen in den Plasmid-Isolations-Kits von Roche (Basel), Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN GmbH, Hilden) und PeqLab (Plasmid Miniprep Kit II, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) hervor. Sie sind universell einsetzbar für die Trägermaterialien von Roche, PeqLab, und Qiagen. Die DNA-Säulen wurden zweimal mit Elutionspuffer und einmal mit sterilem H₂O gereinigt, bei Zimmertemperatur getrocknet und 3-4mal wieder verwendet.

RNase-Lösung

50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, pH 8,0 mit HCl. RNase wurde nach Angaben des Herstellers zugesetzt.

Lyse-Puffer

200mM NaOH, 1% SDS

Binde-Puffer

Wird auch oft als Neutralisationspuffer bezeichnet und besteht aus 4M Guanidinium-Hydrochlorid, 0,5M K-Acetat, pH4,2 mit HCl_{konz.}.

Wasch-Puffer 1

Wasch-Puffer 1 dient als zusätzlicher Waschschrift bei der Plasmidisolierung aus Hefen (Sphäroplasten) und bei *E. coli*-Stämmen mit hoher Nukleaseaktivität (HB101, JM-Stämme). Er besteht aus 5M Guanidinium-Hydrochlorid und 20mM Tris, wobei der pH-Wert 6,6 (25°C)

mit HCl eingestellt wird. Ethanol nach dem Einstellen des pH-Wertes zugeben bis zur Endkonzentration 60%vol.

Wasch-Puffer 2

20mM NaCl, 2mM Tris, 80%vol Ethanol.

Elutions-Puffer

10mM Tris-HCl, pH 8,5.

2.2 Methoden

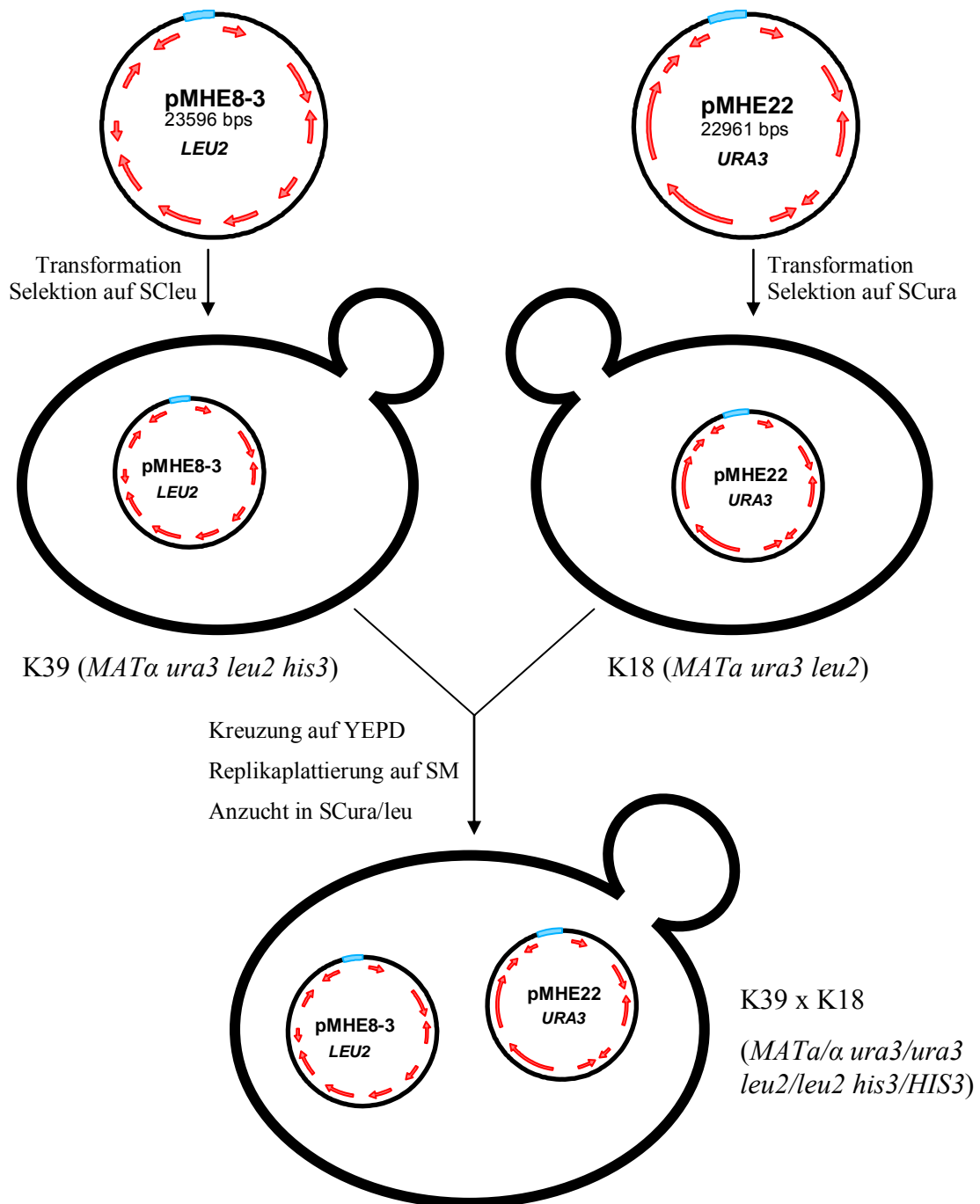
2.2.1 Kreuzungen von Hefestämmen, Tetradenpräparation und Paarungstypbestimmung

Zellen haploider Kreuzungspartner wurden auf Vollmedium gemischt und ausgestrichen. Nach 1-2 Tagen Inkubation wurde auf Selektivmedium, das nur das Wachstum diploider Zellen zuließ, replikaplatziert. Diploide Zellen wurden in Vollmedium bis zur stationären Phase angezogen, mit H₂O gewaschen und als dicker Tropfen auf KAc-Agarplatten aufgebracht. Nach 3-5 Tagen wurden die sporulierten Zellen in 0,5ml H₂O aufgenommen und die Ascuswände durch Zugabe von Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Boehringer, Mannheim) für 15-20 min bei Zimmertemperatur verdaut. Die Isolierung der Sporen wurde mit einem Mikromanipulator (Singer Instruments, Watchet Somerset, GB) durchgeführt. Die Auskeimung der Sporen erfolgte auf Vollmedium. Die Paarungstypbestimmung erfolgte mit Hilfe der *S. cerevisiae*-Stämme LD3R-7B (*MATa*) und SMC-19A (*MATα*). Von den zu testenden Stämmen wurden Replikate auf Vollmedium-Platten hergestellt, die mit je einem dieser Testerstämme überzogen waren. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C wurde auf Minimalmedium replikaplatziert. Die auf diesem Medium gewachsenen Abdrücke zeigten dann Stämme mit entgegengesetzten Paarungstyp an.

2.2.2 Konstruktion von diploiden Doppeltransformanten

Zur Konstruktion diploider Doppeltransformanten wurden die beiden isogenen Rezipienten K18 und K39 unterschiedlichen Paarungstyps jeweils mit den Plasmiden pJJH543, pMHE1, pMHE2, pMHE3, pMHE4, pMHE5, pMHE6, pMHE7 und pMHE8-3 transformiert und "Masterplates" erstellt. Durch Kreuzung der haploiden Transformanten auf YEPD-Agarplatten und nachfolgender Replikaplatzierung auf SM-Medium wurden diploide Doppeltransformanten erhalten, die auf SCura/leu Agarplatten abgeimpft wurden. Entsprechend wurden Kontrollstämme durch Kreuzung haploider Transformanten mit YEp351 bzw. YEp352 hergestellt (Abb. 2.2.2)

Abb. 2.2.2 Konstruktion von diploiden Hefestämmen



Die gewünschten Glykolyseplasmide mit unterschiedlichen Selektionsmarkern (hier beispielhaft pMHE8-3 mit *LEU2* und pMHE22 mit *URA3*) wurden jeweils in einen der Stämme K18 oder K39 transformiert. Nach Selektion auf SCura (pMHE22) und SCleu (pMHE8-3) wurden die Stämme gekreuzt, so dass die diploide Transformante mit der Plasmidkombination pMHE8-3/pMHE22 entstand. Die durch Kreuzung auf YEPD und Replikaplattierung auf SM erhaltenen diploiden Zellen wurden auf SCura/leu selektiert. Alle anderen im Text beschriebenen diploiden Transformanten wurden analog erhalten.

2.2.3 PCR ("Polymerase Chain Reaction")

Die PCR wurde zur Amplifikation aller Glykolysegene, die in dieser Arbeit kloniert wurden, genutzt. Ein typischer Ansatz bestand aus 5µl dNTP-Mix (Fermentas), 5µl Expand High Fidelity Puffer (10x) mit MgCl₂ (15mM), 1µl MgCl₂-Lösung (25mM), 2µl je Primer (10pmol/µl), 1-3µl "template"- DNA (bei Einsatz von Plasmiden ≈ 20ng, bei Einsatz von genomischer DNA ≈ 200ng), 0,7µl Expand High Fidelity Enzym-Mix, mit sterilem Wasser auf 50µl aufgefüllt. In Tabelle 2.2.3 sind die Temperaturprogramme für jedes Gen angegeben. Die PCR wurde in allen Fällen mit dem High Fidelity PCR System (Roche, Basel, CH), durchgeführt. Als Ausnahme davon wurde *TDH2* in pMHE11 und pMHE8-3 mit Herculase (Stratagene, La Jolla, USA) hergestellt.

Tab. 2.2.3 Temperaturprogramme der PCR zur Gewinnung von Glykolysegenen

Gen	Plasmid	Programm
<i>HXK2</i>	pMHE1	94°C 3', [94°C 40'', 53°C 1'30'', 68°C 3' (35 Zyklen)], 68°C 30', 4°C 12h
<i>ADHI</i>	pMHE3	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3' (35 Zyklen)], 68°C 30', 4°C 15h
<i>PGII</i>	pMHE5	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>TPII</i>	pMHE7	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>PDC1</i>	pMHE2	95°C 5', [94°C 40'', 58°C 1', 68°C 4' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>PGK1</i>	pMHE4	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>ENO2</i>	pMHE6	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>TDH1</i>	pMHE8-1	95°C 3', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 20', 4°C 15h
<i>TDH2</i>	pMHE8-2	95°C 3', [94°C 30'', 58°C 45'', 68°C 3' (35 Zyklen)], 68°C 5', 4°C 15h
<i>TDH2</i>	pMHE8-3	95°C 5', [94°C 45'', 58°C 1'30'', 68°C 3'30'' (35 Zyklen)], 68°C 30', 4°C 15h

2.2.4 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der Plasmidkonstrukte wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Dazu wurde das entsprechende Plasmid nach Herstellerangaben (Fermentas) restringiert. Eine typische Zusammensetzung eines 20µl-Restriktionsansatzes bestand aus 2µl

Restriktionspuffer, 2µl 10x Plasmidlösung, 0,5 µl (= 5U) Restriktionsenzym und 15,5 µl H₂O. Nach Inkubation bei 37°C für mindestens 30 Minuten wurde der gesamte Ansatz mit 5µl 6x Ladepuffer (Maniatis *et al.*, 1982) in die Taschen eines 1,5-1,8% Agarose-Gels pipettiert. Als Standard diente λ-DNA, die entweder mit *EcoRI/HindII* oder kombiniert mit *EcoRI/HindIII* und *HindIII* restringiert wurde, oder eine 1kb DNA Leiter (New England Biolabs). Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Laufpuffer (40mM Tris/HCl pH 8,0; 20mM NaAc; 2mM EDTA) verwendet. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 15 min mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend photographisch dokumentiert (LTF- Labortechnik GmbH & Co KG, Wasserburg).

2.2.5 Gelisolierung

Die Isolierung von DNA-Stücken aus Agarosegel wurde mit DNA-Purification Kits von Bio-Rad, Hercules, USA, bzw. dem "High Pure PCR Product Purification Kit" von Roche, Basel, nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der RbCl-Methode von Hanahan (Hanahan, 1985).

2.2.7 Transformation von Hefe

Die Transformation von Hefe geschah bis zur Fertigstellung von pMHE6 mit der Methode von (Klebe *et al.*, 1983), modifiziert durch (Dohmen *et al.*, 1991). Die Zellen wurden bei -74°C gelagert. Ab der Konstruktion von pMHE7 und für die Transformanten für die physiologischen Messungen wurden die Lithium-Acetat-Methode (Gietz *et al.*, 1992; Gietz und Woods, 2002) zur Transformation verwendet. Es wurden Übernachtskulturen angezogen und damit 50ml Medium, das auf 30°C vortemperiert wurde, auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml angeimpft. Bei einer Zelldichte von mindestens 2×10^7 Zellen/ml wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal in sterilem Wasser gewaschen und in 1ml sterilem Wasser resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und abzentrifugiert (13.000rpm, 3min). Das Gefäß wurde mit sterilem Wasser auf 1ml aufgefüllt und das Zellsediment suspendiert und in 100µl-Portionen aliquotiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Den Zellen wurde das vorbereitete Transformationsgemisch zugegeben.

Das Transformationsgemisch wurde zuvor auf Eis in Eppendorf-Gefäße pipettiert und bestand aus 240µl PEG-Lösung (PEG 3500 50% w/v), 36µl LiAc-Lösung (LiAc 1,0M), 50µl denaturierte Einzelstrang-DNA, 2mg/ml und 34µl Plasmid/Wasser-Mischung. Die Zellen

wurden im Transformationsgemisch resuspendiert und für 40min bei 42°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (300rpm, 5min) wurden die Zellen zur Regeneration bei 30°C in YEPD inkubiert, nach 4-8h zentrifugiert und mit 100-200µl sterilem Wasser auf Selektivmedium ausplattiert. Bei der Cotransformation zur Konstruktion der Glykolyseplasmide wurden die Ausgangsplasmide jeweils mit Hilfe der singulären Restriktionserkennungsstelle in einem entsprechenden Ansatz linearisiert und gleichzeitig mit dem PCR-Produkt des einzufügenden neuen Glykolysegens transformiert. Die linearisierten Ausgangsplasmide wurden vor der Transformation durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die DNA-Mengen der gereinigten linearisierten Ausgangsplasmide und der PCR-Ansätze wurden in Agarosegelen abgeschätzt und die PCR-Produkte im Verhältnis von 4:1 zur Plasmid-DNA bei der Cotransformation eingesetzt.

2.2.8 Isolierung genomischer DNA aus Hefe

DNA aus *S. cerevisiae* wurde nach einer Modifikation der Methode von Struhl (Struhl *et al.*, 1979) isoliert. Nach einer 60-minütigen Zymolyase-Behandlung bei 37°C in Sphäroplasten-Puffer (0,9M Sorbit, 0,1M EDTA, 0,02M DTT, Zymolyase 20T (2mg/ml)) wurden die Zellen bei 3000 rpm 10' zentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen. Die Membranen wurden durch Zugabe von 0,1x Volumen 10%iger SDS-Lösung und Inkubation bei 65°C in 30' zerstört. Nach Zugabe von 1/3 Volumen 5M Kalium-Acetat-Lösung und 1h Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat abzentrifugiert. Die DNA des Überstandes wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol gefällt. Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und in 200µl RNase-Lösung (vgl. Abschnitt 2.1.6) aufgenommen und 30' bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20µl 3M Natrium-Acetat-Lösung und 2,5-fachem Volumen Ethanol wurde 10' bei 13.000rpm zentrifugiert und das bei Raumtemperatur getrocknete Sediment in 100-150µl TE-Puffer aufgenommen.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* geschah nach den Standard-Vorschriften zu den "Plasmid-Isolation Kits" von Roche (Basel), Qiagen (Hilden) oder Peqlab (Erlangen).

2.2.10 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA und RNA wurde spektralphotometrisch bei 260nm und 280nm bestimmt (Maniatis *et al.*, 1982). Bei einer gereinigten DNA-Präparation sollte der Quotient E_{260nm}/E_{280nm} bei 1,8 liegen; für DNA entspricht $E_{260nm}=1$ einer Konzentration von 50µg/ml. Bei einer gereinigten RNA-Präparation sollte der Quotient E_{260nm}/E_{280nm} bei 2,1 liegen; für

RNA entspricht $E_{260\text{nm}}=1$ einer Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$. Die Konzentrationen von Plasmid-DNA wurde i.d.R. nach Gelelektrophorese abgeschätzt.

2.2.11 Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen

Zur Herstellung von Rohextrakten zur Messung der spezifischen Enzymaktivitäten der Glykolyseenzyme wurden aus Kulturen zum gewünschten Zeitpunkt je nach Zelldichte 5-10ml entnommen. Die Zellen wurden gesammelt, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und mit Phosphat-Puffer (4°C , 50mM , $\text{pH}7,0$) gewaschen. Dem Zellsediment wurden $500\mu\text{l}$ Glycerperlen ($\text{Ø } 0,25\text{-}0,5\text{mm}$) und $500\mu\text{l}$ kalter Phosphat-Puffer zugegeben. Der Zellaufschluss geschah bei 4°C für 7 min (IKA Vibrax-VXR, VX2 mit Aufsatz für Zentrifugenröhrchen). Anschließend wurde nochmals $500\mu\text{l}$ Phosphat-Puffer (50mM) zugegeben und der Überstand in Eppendorf-Gefäße überführt und die Zelltrümmer bei 4°C und 13000 rpm für 10 min durch Zentrifugation (MIKRO 22R Firma Hettich Zentrifugen) entfernt. Die Überstände wurden in $1,5\text{ ml}$ Eppendorf-Gefäße überführt und während der Enzymmessungen auf Eis gelagert.

2.2.12 Bestimmung des Proteingehalts in Rohextrakten

Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit der Micro-Biuret-Methode (Zamenhoff, 1957) bestimmt. Vom Leerwert und von den Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu $950\mu\text{l}$ destilliertem Wasser wurden $50\mu\text{l}$ Rohextrakt bzw. für den Leerwert $50\mu\text{l}$ Phosphat-Puffer (50mM) zugefügt. Nach Zugabe von $500\mu\text{l}$ Biuretlösung (10N NaOH , $1\% \text{CuSO}_4$) wurde durch Kippen des geschlossenen Gefäßes gemischt. Nach Inkubation bei Zimmertemperatur für 15-30 Minuten wurde die Extinktion bei 290nm im Photometer (DU800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Fullerton, USA) in Quarzküvetten gemessen. Der Proportionalitätsfaktor zwischen gemessener Extinktion und Proteingehalt einer Lösung wurde durch Aufstellen einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin (BSA, $20\text{-}700\mu\text{g/ml}$) ermittelt.

2.2.13 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Glykolyseenzyme

Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch bei 30°C bestimmt (DU800 Spectrophotometer, BeckmanCoulter, Fullerton, USA). Die zu untersuchende Reaktion wurde an einen durch NAD- oder NADP-abhängige Dehydrogenasen katalysierten Schritt gekoppelt. Der Verbrauch oder die Bildung von Reduktionsäquivalenten wurde durch die Messung der Extinktionsänderung bei 340nm verfolgt, die dem Substratverbrauch proportional ist. Aus der Extinktionsänderung wurde der Substratumsatz errechnet. Alle Substanzen und Hilfsenzyme wurden in optimalen Konzentrationen eingesetzt und wurden von Sigma (Honk-Town, USA)

und Roche (Basel) bezogen. Die Rohextrakte wurden auf Eis gelagert und kurz vor der Messung in die fertige Testlösung pipettiert und im Photometer während eines 3minütigen Laufs ohne Substrat, der zur Korrektur des eigentlichen Substratlaufes diente, auf 30°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Testlösungen wurden stets frisch angesetzt. Es wurden jeweils mindestens Doppelbestimmungen für jeden Rohextrakt durchgeführt.

2.2.13.1 Hexokinase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971), modifiziert nach van Doorn *et al.* (1988), durchgeführt. Die Testlösung bestand aus ATP (1mM), MgCl₂ (10mM), NADP (0,5mM), EDTA (0,2mM) und dem Hilfsenzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (0,3 U/ml) in Imidazol-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glucose (Endkonzentration 5mM) gestartet.

2.2.13.2 Phosphoglucose-Isomerase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus MgCl₂ (10mM), KCl (100mM), NADP (0,5mM), EDTA (0,1mM) und dem Hilfsenzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (0,3 U/ml) in Imidazol-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fructose-6-phosphat (Endkonzentration 5mM) gestartet.

2.2.13.3 Phosphofruktokinase

Der Test wurde nach Rodicio *et al.* (2000) durchgeführt. Die Testlösung enthielt ATP (1mM), ADP (0,3mM), AMP (0,1mM), Fru-2,6-P₂ (5μM), MgCl₂ (10mM), NADH (0,2mM) und den Hilfsenzymen Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (1 U/ml), Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (0,5 U/ml) und Triosephosphat-Isomerase (0,5 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fructose-6-phosphat (Endkonzentration 5mM) gestartet.

2.2.13.4 Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase

Der Test wurde nach Boles und Zimmermann (1993) durchgeführt. Der Testmix bestand aus MgCl₂ (5mM), KCl (30mM), NH₄Cl (10mM), MnCl₂ (0,3mM), Zinkacetat (0,2mM), NADH (0,2mM) und den Hilfsenzymen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (0,5 U/ml) und Triosephosphat-Isomerase (0,5 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fructose-1,6-diphosphat (Endkonzentration 2mM) gestartet.

2.2.13.5 Triosephosphat-Isomerase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus MgCl_2 (10mM), NADH (0,2mM), EDTA (0,1mM) und dem Hilfsenzym Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (0,5 U/ml) in Imidazol-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycerinaldehyd-3-phosphat (Endkonzentration 5mM) gestartet.

2.2.13.6 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GapDH)

Der Test wurde nach McAllister und Holland (1985) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus ATP (1mM), MgCl_2 (10mM), NADH (0,2mM), Cystein (5mM) und dem Hilfsenzym 3-Phosphoglycerat-Kinase (1 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3-Phosphoglycerat (Endkonzentration 4mM) gestartet.

2.2.13.7 Phosphoglycerat-Kinase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus ATP (10mM), MgCl_2 (10mM), KCl (100mM), NADH (0,2mM), Cystein (5mM) und dem Hilfsenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (1 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3-Phosphoglycerat (Endkonzentration 10mM) gestartet.

2.2.13.8 Phosphoglycerat-Mutase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Der Testmix bestand aus ADP (1mM), MgCl_2 (10mM), NADH (0,2mM) und den Hilfsenzymen Pyruvat-Kinase (1 U/ml), Laktat-Dehydrogenase (1 U/ml) und Enolase (0,5 U/ml) in Imidazol-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3-Phosphoglycerat (Endkonzentration im Mix 10mM) gestartet. Der allosterische Effektor 2,3-Bisphosphoglycerat konnte bei späteren Messungen nicht mehr angewendet werden, da die verfügbaren Produkte bei Einsatz im Test "Blindläufe" bewirkten, die wahrscheinlich durch eine Verunreinigung mit 3-Phosphoglycerat und/oder 2-Phosphoglycerat zu erklären sind. Auch neue Präparationen von 3-Phosphoglycerat lieferten starke "Blindläufe" und machten eine Bestimmung unmöglich. Erst nach Einsatz einer älteren Präparation von 3-Phosphoglycerat, die von Prof. Dr. Wiczorek zur Verfügung gestellt wurde, konnten zuverlässige Bestimmungen durchgeführt werden.

2.2.13.9 Enolase

Der Test wurde nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus ADP (1mM), MgCl₂ (10mM), KCl (100mM), NADH (0,2mM) und den Hilfsenzymen Pyruvat-Kinase (1 U/ml) und Laktat-Dehydrogenase (1 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2-Phosphoglycerat (Endkonzentration 10mM) gestartet. Bei der Durchführung dieses Tests musste auf 2-Phosphoglycerat zurückgegriffen werden, das nur als Barium-Salz verfügbar war. Um die Trübung, die durch Zugabe des Enzympräparates in der Testlösung entstand, zu minimieren, wurden die Suspensionen der Hilfsenzyme vorher abzentrifugiert, um die Enzyme nach Entfernen des Überstands mit so wenig Sulfat wie möglich in Testlösung aufzunehmen. Trotz leichter Trübung konnten reproduzierbare Messwerte erhalten werden.

2.2.13.10 Pyruvat-Kinase

Der Test wurde modifiziert nach Maitra und Lobo (1971) durchgeführt. Die Testlösung bestand aus ADP (0,6mM), MgCl₂ (10mM), KCl (100mM), NADH (0,2mM), Fru-1,6-P₂ (1mM) und dem Hilfsenzym Laktat-Dehydrogenase (1 U/ml) in Phosphat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phosphoenol-Pyruvat (PEP) (Endkonzentration im Mix 10 mM) gestartet.

2.2.13.11 Pyruvat-Decarboxylase

Der Test wurde nach Schmitt und Zimmermann (1982) durchgeführt. Der Testmix bestand aus MgCl₂ (10mM), KCl (100mM), NADH (0,2mM), Cystein (1,7mM), Thiaminpyrophosphat (=Co-Carboxylase)(1,6mM) und dem Hilfsenzym Alkohol-Dehydrogenase (1 U/ml) in Citrat-Puffer (50mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Pyruvat (Endkonzentration 33mM) gestartet.

2.2.13.12 Alkohol-Dehydrogenase

Der Test wurde modifiziert nach Bergmeyer (1974) durchgeführt. Der Testmix bestand aus Semicarbazid-Hydrochlorid (6,2mM), Glutathion (GSH, 1mM) und NAD (2mM) Natrium-Pyrophosphat-Puffer (85,5mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol (Endkonzentration 600mM) gestartet.

2.2.14 Berechnung der spezifischen Aktivitäten der Glykolyseenzyme

Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden aus den Umsatzraten und dem Proteingehalt der Rohextrakte berechnet.

$$\text{Es gilt: Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\Delta E \times V_K \times F}{\varepsilon \times d \times c \times V_{Pr}}$$

ΔE = gemessene Extinktionsänderung (1/min)

ε = molarer Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm (6,22cm²/μmol)

d = Schichtdicke (Küvette) (1cm)

c = Proteinkonzentration der Enzymlösung (mg/ml)

V_K = Volumern der Küvettenfüllung (ml)

V_{Pr} = Volumen der eingesetzten Probe (ml)

F = Verdünnungsfaktor

Bei den Tests für Phosphofruktokinase und Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase ist darauf zu achten, dass pro umgesetztem Substrat zwei Moleküle NADH oxidiert werden. Daher ist in der Formel der Faktor $\frac{1}{2}$ einzufügen.

2.2.15 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden im Labor von Dr. rer. nat. Heinz Gabriel im Zentrum für Medizinische Genetik, Osnabrück, durchgeführt.

2.2.16 "Real-Time"-RT-PCR

2.2.16.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde zunächst ein Zymolyase-Aufschluss der zu untersuchenden Hefekultur durchgeführt. Dazu wurden einer exponentiell wachsenden Kultur maximal 10 OD₆₀₀-Einheiten entnommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 794μl Sphäroplasten-Puffer (mit 0,02M DTT) aufgenommen und mit 6μl Zymolyase (12,5g/ml Zymolyase 20.000) 60min bei 37°C bei gleichmäßigem Kippen inkubiert. Die Sphäroplasten wurden bei 300 rpm/min in 10min abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Sphäroplastensediment wurde bis zum Gebrauch eingefroren. Die eigentliche Isolierung der RNA geschah nach den Anweisungen im RNeasy-Kit (Qiagen). Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben, durchgeführt.

2.2.16.2 Herstellung von cDNA

Die reverse Transkription erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad. Als "Primer" kamen TDH2RT2 für *TDH2*, ActRT4 für *ACT1* und HXTrt3 für *HXT1* zum Einsatz. Da in vorangegangenen Untersuchungen der vom Hersteller empfohlene Einsatz von 1 µg RNA zu sehr niedrigen Schwellenwert-Zyklen bei der RT-PCR führte, wurde die Startmenge der RNA auf ca. die Hälfte eingestellt. Der Messwert für die RNA-Konzentration der Isolierung aus Kulturen mit pMHE7/pMHE8-3 lag sehr niedrig und außerhalb der geforderten Genauigkeit (vgl. Abschnitt 2.2.10), weshalb mit dem doppelten Volumen im Verhältnis zur Kontrolle gearbeitet wurde. Es wurden 6 µl der RNA-Lösung von YEp351/YEp352 eingesetzt, was 0,69 µg RNA entsprach. Für die Isolierung aus pMHE7/pMHE8-3 wurden 12 µl eingesetzt, was 0,45 µg RNA entsprach.

2.2.16.3 Herstellung von Plasmiden als Mengenstandard

Zur Bestimmung der Kopienzahl von RNA-Molekülen wurde in der "Real-Time"-RT-PCR parallel eine Kalibriergerade erstellt. Als Matrize dienten dazu die Plasmide pMHE11 für *TDH2* und pJJH543 für *HXT1*, sowie pJJH13 für *ACT1*, die alle auf die vier Konzentrationsstufen 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 Kopien/µl eingestellt wurden. Dazu wurde zunächst die DNA-Menge in den Plasmidpräparationen von pMHE11 und pJJH543 photometrisch bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.10) und DNA auf die Kopienzahl für 10^8 Kopien/µl umgerechnet. Für pJJH13 wurden die Verdünnungen von Diana Augustin zur Verfügung gestellt. Zur Berechnung der Kopienzahl wurde auf die bekannte Molekülmasse des Plasmides pBR322 zurückgegriffen, die 2,83 g/µmol beträgt. Daraus läßt sich die Anzahl der

Plasmide/µg berechnen aus:
$$\frac{10^{-6} \text{ mol}}{2,83 \times 10^6 \text{ } \mu\text{g}} = \frac{10^{-12} \times 6,022 \times 10^{23}}{2,83 \text{ } \mu\text{g}} = 2,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle/} \mu\text{g}.$$

Unter der Annahme, dass sich die Nukleinsäurezusammensetzung im Vergleich zu pBR322 nicht ändert, lässt sich die Anzahl der Plasmide/µg berechnen aus dem Verhältnis der Plasmidgrößen.

Für pMHE11 gilt:
$$\frac{2 \times 10^{11} \times bp_{pBR322}}{\mu\text{g} \times bp_{pMHE11B}} = \frac{2 \times 10^{11} \times 4363 \text{ bp}}{\mu\text{g} \times 5183 \text{ bp}} = 1,79 \times 10^{11} \text{ Moleküle/} \mu\text{g}$$

Für pJJH543 (15244 bp) errechnet sich entsprechend $6,1 \times 10^{10}$ Moleküle/µg.

In den Lösungen mit 276 µg/ml (pMHE11) und 67,3 µg/ml (pJJH543) liegen demnach also folgende Plasmidkonzentrationen vor

$$\text{pMHE11: } 276\mu\text{g} \times \frac{1,79 \times 10^{11} / \mu\text{g}}{1000\mu\text{l}} = 4,9 \times 10^{10} \text{ Moleküle}/\mu\text{l},$$

$$\text{pJJH543: } 67,3\mu\text{g} \times \frac{6,1 \times 10^{10} / \mu\text{g}}{1000\mu\text{l}} = 4,1 \times 10^9 \text{ Moleküle}/\mu\text{l}.$$

Daraus wurden jeweils 1 ml einer Verdünnung mit 1×10^8 Plasmiden/ μl hergestellt. Aus diesen Verdünnungen wurden die weiteren Verdünnungsstufen mit 10^7 , 10^6 und 10^5 Plasmiden/ μl hergestellt.

2.2.16.4 Durchführung der "Real-Time"-RT-PCR

Die "Real-Time"-RT-PCR wurde mit dem iCycler (iQ™ Real Time PCR, Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. In die Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurden die cDNA-Proben der zu untersuchenden Stämme in geeigneter Reihenfolge einpipettiert, wobei für das jeweils zu untersuchende Gen die Standards, die zwei Proben als Doppelbestimmung und die Primerkontrolle in eine Reihe aufgebracht wurden. Vor der Zugabe des "Supermixes" zur Durchführung der RT-PCR (iQ™ SYBR® Green Supermix Sample, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde der Thermocycler auf die Beschickung des "wells" programmiert. Nach Beendigung des Laufes erstellt der Thermocycler die Kalibriergerade und gibt die lineare Gleichung sowie den Korrelations-Koeffizienten an. Durch die Anwendung der Gleichung kann für jeden Messwert der Proben und Kontrollen die Kopienzahl der RNA-Moleküle errechnet werden (vgl. Abschnitt 2.2.16.5).

2.2.16.5 Berechnung der Kopienzahl von mRNA-Molekülen

Die vom Thermocycler angegebene Gleichung der Form $Y = -a \times \log x + b$ stellt die Kalibriergerade dar, wobei

Y = "Schwellenwert-Zyklus" (als Nummer des Zyklus', bei dem erstmals der Schwellenwert ("threshold") überschritten wird)

a = ermittelte Steigung der Kalibriergeraden

x = Anzahl der Kopien der RNA-Moleküle

b = Konstante (y-Achsenabschnitt, also der theoretische "threshold" bei 10^0 Kopien)

Aus der umgeformten Darstellung lässt sich anhand der ermittelten "Schwellenwert-Zyklen" der Logarithmus der Anzahl der RNA-Moleküle in der cDNA-Probe errechnen:

$\log x = \frac{Y - b}{a}$. Aus $x = 10^{\log x}$ errechnet sich die Anzahl der RNA-Moleküle in der Probe. Da

davon ausgegangen wird, dass die Anzahl der cDNA-Moleküle gleich der Anzahl der RNA-

Moleküle in der Probe ist, wird somit für jedes untersuchte Gen die Anzahl der in der Probenmenge vorhandenen RNA-Moleküle ermittelt. Um eine Aussage über das Expressionsniveau eines Gens treffen zu können, wurden sie zum Wert des konstitutiv exprimierten Gens *ACT1* ins Verhältnis gesetzt. Das Expressionsniveau

$$EN_{TDH2} = \frac{[RNA_{TDH2}]}{[RNA_{ACT1}]} \text{ bzw. } EN_{HXT1} = \frac{[RNA_{HXT1}]}{[RNA_{ACT1}]}$$

wurde für die Proben pMHE7/pMHE8-3 und die Kontrollen YEp351/YEp352 ermittelt. Um die Veränderung im Expressionsniveau im Teststamm pMHE7/pMHE8-3 gegenüber YEp351/YEp352 darzustellen, wurde der Faktor

$$\Delta EN = \frac{[EN_{TDH2}]_{pMHE7/8-3}}{[EN_{TDH2}]_{YEp351/352}} \text{ bzw. } \Delta EN = \frac{[EN_{HXT1}]_{pMHE7/8-3}}{[EN_{HXT1}]_{YEp351/352}}$$

berechnet. Überexpression liegt vor bei $\Delta EN > 1$, verminderte Expression liegt vor bei $\Delta EN < 1$.

2.2.17 Aufnahme von Wachstumskurven

Zu untersuchende Stämme wurden auf $OD_{600} = 0,5$ angeimpft und bei 30°C und 120-150rpm auf einem Infors-Schüttler inkubiert. Als Kulturgefäße kamen sterile Erlenmeyerkolben mit Alukappe mit 5-10fachem Volumen der Kulturmenge zum Einsatz. Die Entnahme von Kultursuspension erfolgte mit sterilen Glaspipetten. Die Zellmasse wurde indirekt über die Messung der OD_{600} (DU800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Fullerton, USA) durch Herstellen geeigneter Verdünnungen (1/1 bis 1/20) mit H₂O ermittelt. Zur Ermittlung der physiologischen Leistungen der Hefestämme wurde gleichzeitig mit den Proben für die OD-Messung auch 1ml Kultur entnommen. Die Proben wurden umgehend abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert für die Untersuchungen mittels HPLC.

2.2.18 Bestimmung von $Y_{(P/X)}$, $Y_{(S/X)}$, $Y_{(P/S)}$, μ und g mit HPLC

Die Bestimmung der Konzentrationen von Glucose und Ethanol wurde mittels HPLC (Bischoff Modell 2200) durchgeführt. Als Autosampler diente Bischoff Modell 728 (Bischoff, Leonberg) und als Trennsäule kam Aminex HPX-87 H column (Bio-Rad, München) zum Einsatz. Detektiert wurde mit dem RI detector ERC7510 (ERC, Altegolfsheim) und die Datenbearbeitung wurde mit McDACq15 (Bischoff, Leonberg) durchgeführt. Als Elutionspuffer diente 0,1N Schwefelsäure. Die Kalibrierung wurde mit Stammlösungen von 20g/l Glucose und 100g/l Ethanol mit den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 durchgeführt.

2.2.18.1 Ethanolbildungs-Koeffizient $Y_{(P/X)}$

Der Ethanolbildungs-Koeffizient oder $Y_{(P/X)}$ ist der Quotient aus gebildetem Produkt P (Ethanol) und der in derselben Zeit entstandenen Biomasse X und wird in mg Ethanol/ mg

Trockengewicht angegeben. $Y_{(P/X)}$ wird für exponentiell wachsende Zellen ermittelt. Er wurde graphisch ermittelt durch das Auftragen der Ethanolkonzentration auf der x-Achse gegen die Trockensubstanz auf der y-Achse und Ermittlung der Steigung durch lineare Regression. Das Trockengewicht wurde indirekt über die Messung der OD_{600} und Umrechnung mit dem Faktor 0,34 (0,34mg/ml bei $OD_{600}=1$) ermittelt (Reifenberger, 1995). Aus $Y_{(P/X)}$ lässt sich die Ethanolbildungsrate q_{eth} als Produkt aus Ethanolbildungs-Koeffizient $Y_{(P/X)}$ und μ_{max}

$$\text{berechnen: } q_{eth} = Y_{(P/X)} \times \mu_{max} \left[\frac{mg}{mg \times h} \right].$$

2.2.18.2 Glucoseverbrauchs-Koeffizient $Y_{(S/X)}$

Der Glucoseverbrauchs-Koeffizient $Y_{(S/X)}$ ist der Quotient aus verbrauchtem Substrat S (Glucose) und der in derselben Zeit entstandener Biomasse X, und wird in mg Glucose/ mg Trockengewicht angegeben. $Y_{(S/X)}$ wird für exponentiell wachsende Zellen ermittelt. Er wurde graphisch ermittelt durch das Auftragen der Glucosekonzentration auf der x-Achse gegenüber der Trockensubstanz auf der y-Achse und Bestimmung der Steigung durch lineare Regression. Das Trockengewicht wurde indirekt über die Messung der OD_{600} und Umrechnung mit dem Faktor 0,34 (Reifenberger, 1995) ermittelt (0,34mg/ml bei $OD_{600}=1$). Aus $Y_{(S/X)}$ lässt sich die Glucoseverbrauchsrate r_{glu} als Produkt aus Glucoseverbrauchs-

$$\text{Koeffizient } Y_{(S/X)} \text{ und Wachstumsrate } \mu_{max} \text{ berechnen: } r_{glu} = Y_{(S/X)} \times \mu_{max} \left[\frac{mg}{mg \times h} \right]$$

2.2.18.3 Ausbeute-Koeffizient $Y_{(P/S)}$

Der Ethanolausbeute-Koeffizient oder Ertrags-Koeffizient $Y_{(P/S)}$ ist der Quotient aus gebildetem Produkt P (Ethanol) und dem in derselben Zeit verbrauchten Substrat S (Glucose), und wird in mg Ethanol/ mg Glucose angegeben. $Y_{(P/S)}$ wird für exponentiell wachsende Zellen ermittelt. Er wurde graphisch ermittelt durch das Auftragen der Ethanolkonzentration auf der x-Achse gegenüber der Trockensubstanz auf der y-Achse und Bestimmung der Steigung durch lineare Regression. Die Ermittlung des Trockengewichtes geschah indirekt über die Messung der OD_{600} , wobei $OD_{600}=1$ einem Zelltrockengewicht von 0,34mg/ml entspricht.

2.2.18.4 Wachstumsrate μ

Die Wachstumsrate μ ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums und wurde ermittelt aus der Gleichung:

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{(t_1 - t_0)} = \frac{\log x_1 - \log x_0}{\log e \times (t_1 - t_0)} = \frac{\log x_1 - \log x_0}{(t_1 - t_0)} \times 2,3026. \text{ Dabei ist } t_0 \text{ der Zeitpunkt 0, } t_1$$

der beliebig spätere Zeitpunkt 1, x_0 die Zellmasse zum Zeitpunkt 0 und x_1 die Zellmasse zum Zeitpunkt 1. Die Einheit der Wachstumsrate ist h^{-1} . Alle in dieser Arbeit ermittelten Wachstumsraten wurden in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt und stellen daher die maximale Wachstumsrate μ_{\max} dar.

2.2.18.5 Generationszeit g

Die Generationszeit g (Verdopplungszeit) ist die für eine Zellteilung benötigte Zeit. Sie hängt direkt mit der Wachstumsrate μ zusammen durch: $g = \frac{\ln 2}{\mu}$. Die Generationszeit wurde in h angegeben.

2.2.19 Nachweis der Plasmide in den Hefestämmen

2.2.19.1 Nachweis mittels Restriktionsanalyse

Die Anwesenheit der Plasmidkonstrukte in den Kulturen wurde durch Isolation von Plasmid aus Hefe überprüft. Dazu wurde die Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* in einem kombinierten Verfahren nach einer Modifikation der Methode von (Struhl *et al.*, 1979) zum Aufschluss der Hefezellen und der Reinigung über DNA-Bindesäulen isoliert. Nach einer 60minütigen Zymolyase-Behandlung bei 37°C in Sphäroplasten-Puffer (0,9M Sorbit, 0,1M EDTA, 0,02M DTT) wurden die Zellen bei 300 U/min 10' zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Sphäroplasten bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung, mindestens jedoch eine Stunde, aufbewahrt. Das Sphäroplastensediment wurde in RNase-Lösung der Plasmid-Isolations-Kits für *E. coli* von Roche, Qiagen oder Peqlab aufgenommen und dem Standardprotokoll gefolgt. Die Plasmidisolierungen aus *S. cerevisiae* dienten der Transformation von *E. coli*. Durch anschließende Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde die Plasmid-DNA amplifiziert und stand für die Restriktionsanalyse zur Verfügung.

2.2.19.2 Nachweis mittels PCR-Technik

Die Anwesenheit der Plasmide pMHE6 und pMHE22 im Rezipientenstamm MDH2 wurde mittels PCR-Technik überprüft. Zur Detektion von pMHE6 dienten die Oligonukleotide MHE6HXTfor und MHEGPMfor, zur Identifizierung von pMHE22 wurden MHE22HXT2for und MHE22TPIrev eingesetzt (Tab. 2.1.3.3).

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Überproduktion aller an der Glucoseverwertung beteiligten Enzyme in einem Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu erreichen, um die Auswirkungen auf Wachstum und Alkoholbildung zu untersuchen. Da es sich hierbei im Wesentlichen um die Enzyme der Glykolyse handelt, ist diese hier als der gesamte Weg der Umsetzung von Glucose zu Ethanol und Kohlendioxid zu verstehen, d.h. die zu überproduzierenden Enzyme umfassen auch den Glucosetransport und die zur Umsetzung von Pyruvat nötigen Schritte. Dazu war zunächst die Klonierung von insgesamt 14 Genen mit einer Gesamtlänge von etwa 40 kb zu inserierender DNA erforderlich. Um diese Aufgabe zu erleichtern, wurde hier eine Strategie mit zwei unterschiedlichen Hochkopienzahl-Vektoren gewählt, in die jeweils die Hälfte der Gene eingebracht werden sollten. Darüber hinaus sollte auch die Expression einer Phosphofruktokinase mit veränderten allosterischen Eigenschaften in diesem Umfeld untersucht werden.

3.1 Plasmidkonstruktionen

Im ersten Teil der Arbeit wurden die nötigen Plasmide konstruiert und verifiziert, die in den späteren Untersuchungen zur Überproduktion der Enzyme dienen.

3.1.1 Konstruktionen zur gleichzeitigen Überproduktion der an der Glucoseverwertung beteiligten Enzyme

Als Basisvektoren dienten die Plasmide YEp351 (*LEU2*) und YEp352 (*URA3*), die durch ihren aus dem natürlichen 2 μ m-Hefeploid stammenden Replikationsursprung in etwa 30 Kopien pro Hefezelle vorliegen (Hill *et al.*, 1986). Darüber hinaus kann in entsprechenden Mangelmutanten auf ihre Anwesenheit selektiert werden, indem definierte Medien ohne Leucin bzw. ohne Uracil zur Hefezucht verwendet werden.

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits die Plasmide pJH542 (YEp352 mit den Genen *PFK1*, *PFK2* und *HXK2*, vgl. Abschnitt 2.1.3) und pJH543 (YEp351 mit den Genen *HXT1*, *FBA1*, *GPM1* und *PYK1*, vgl. Abschnitt 2.1.3) vor. Diese enthielten jeweils eine singuläre Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI, die zur Linearisierung der Plasmide vor der Cotransformation mit neuen PCR-Produkten diente. Die zur PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie zur Amplifikation des jeweiligen genomischen Abschnittes eingesetzt werden konnten und gleichzeitig über etwa 45 bp flankierende Sequenz verfügten, die die Rekombination mit Vektorsequenzen ermöglichen sollten. Als flankierende Bereiche wurden dabei die beidseitig der erwähnten singulären

Restriktionsschnittstelle liegenden Sequenzen des Plasmides gewählt (vgl. Abbildungen in diesem Abschnitt). Schließlich wurde bei der Auswahl der Oligonukleotide darauf geachtet, dass das Produkt der *in vivo*-Rekombination wieder eine singuläre Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI enthielt, um weitere Konstruktionen zu ermöglichen.

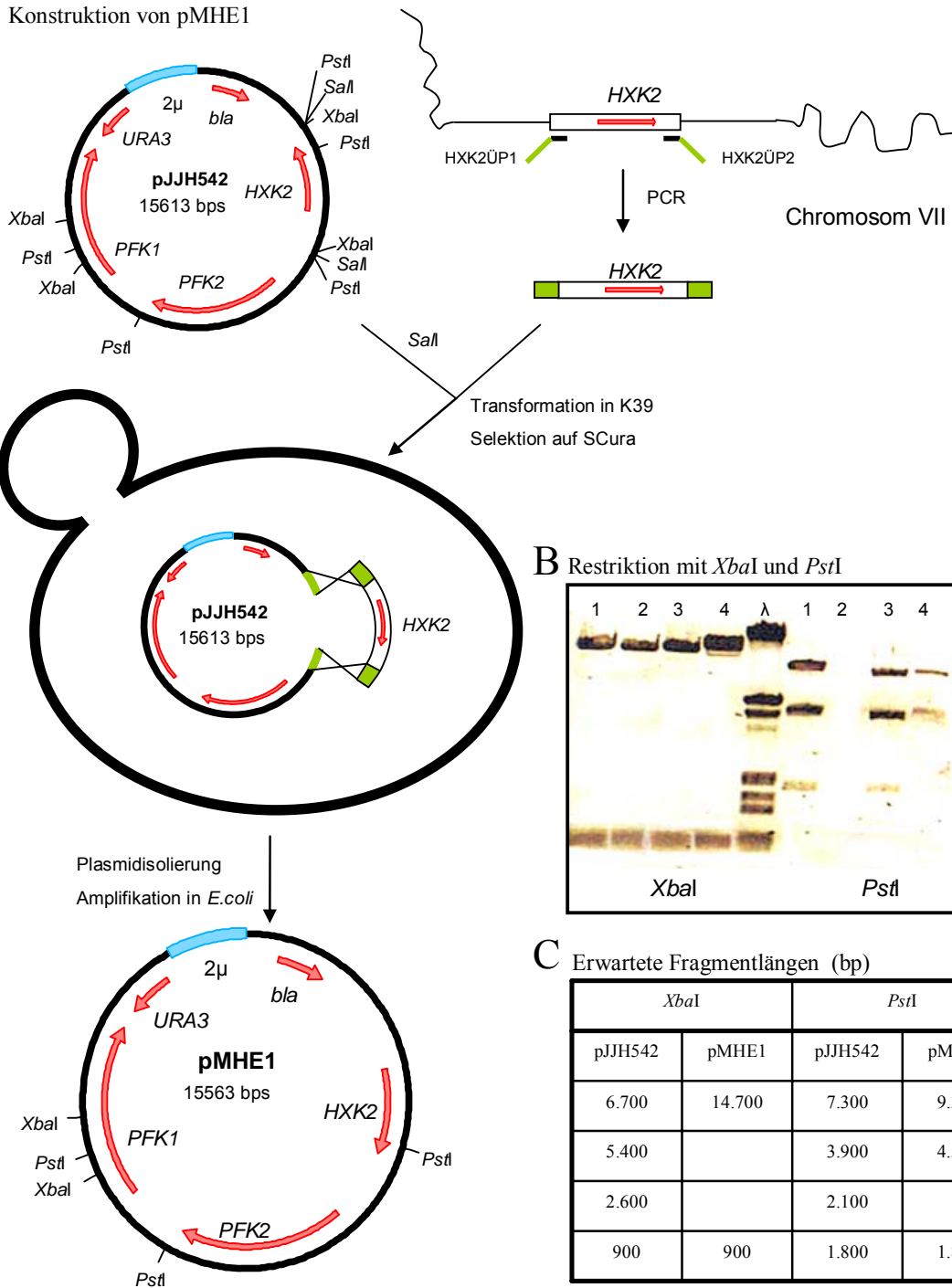
Im Folgenden ist die Konstruktion der einzelnen Plasmide detailliert beschrieben, die mit pMHE1 - pMHE8 bezeichnet wurden. Die ungeradzahlig Konstrukte leiten sich dabei von pJJH542 (*URA3*) ab, die geradzahlig dagegen von pJJH543 (*LEU2*).

3.1.1.1 Konstruktion von pMHE1

Bei der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten von Transformanten des Hefestammes K39 (*ura3 leu2*) mit pJJH542 zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp zwar eine Steigerung der Phosphofruktokinase-Aktivität, nicht aber bei der Hexokinase (Tab. 3.2.1). Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, dass das zuletzt eingebrachte *HXK2*-Gen einen PCR-Fehler enthält. Aus diesem Grund sollte eine fehlerfreie Wildtyp-Kopie erneut eingesetzt werden. Dazu wurde *HXK2* mit Hilfe von PCR mit den Oligonukleotiden HXK2ÜP1 und HXK2ÜP2 (vgl. Tab. 2.1.3.3) aus genomischer DNA des Hefestammes VWH1B amplifiziert. Damit wurde ein Fragment erhalten, das von 756 bp vor dem Translationsstartcodon bis 366 bp hinter dem Translationsstopcodon des *HXK2*-Genes reicht. Dieses wurde zusammen mit dem durch *Sal*I-Restriktion linearisierten Plasmid pJJH542 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht, und Transformanten wurden auf Uracil-freiem Medium selektiert. Aus zwei der Transformanten konnten Plasmide isoliert werden, die *E. coli* ein Wachstum auf Ampicillin-haltigem Medium ermöglichten. Diese sollten entweder ein in Hefe wieder circularisiertes Ausgangsplasmid enthalten, oder aber das in Abb. 3.1.1.1 dargestellte Rekombinationsprodukt pMHE1. Aus jeweils vier der erhaltenen Klone wurden die Plasmide präpariert und einer Restriktionsanalyse unterzogen (Abb. 3.1.1.1). Von den Plasmiden, die die nach einer erfolgreichen *in vivo*-Rekombination erwarteten Restriktionsfragmente zeigten (Proben 1 bis 4), wurde eines für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Aus dem entsprechenden *E. coli*-Klon wurden größere Mengen Plasmid-DNA gereinigt.

Abb. 3.1.1.1 Konstruktion von pMHE1

A Konstruktion von pMHE1



Das nichtfunktionelle *HXK2* in pJJH542 wurde durch eine neue Kopie ersetzt. A: Ausgangsplasmid pJJH542 wurde mit *Sal*I geschnitten und cotransformiert mit dem PCR-Produkt von *HXK2* mit den Oligonukleotiden HXK2ÜP1 und HXK2ÜP2. In der Hefezelle erfolgte homologe Rekombination. Nach Plasmidisolierung und Amplifizierung in *E. coli* lag pMHE1 vor. B: Restriktionsanalyse von pMHE1 mit *Xba*I und *Pst*I aus je zwei *E. coli*-Klonen aus Hefetransformante 1 (1, 2) und aus Hefetransformante 2 (3, 4), Standard (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktionen aus B.

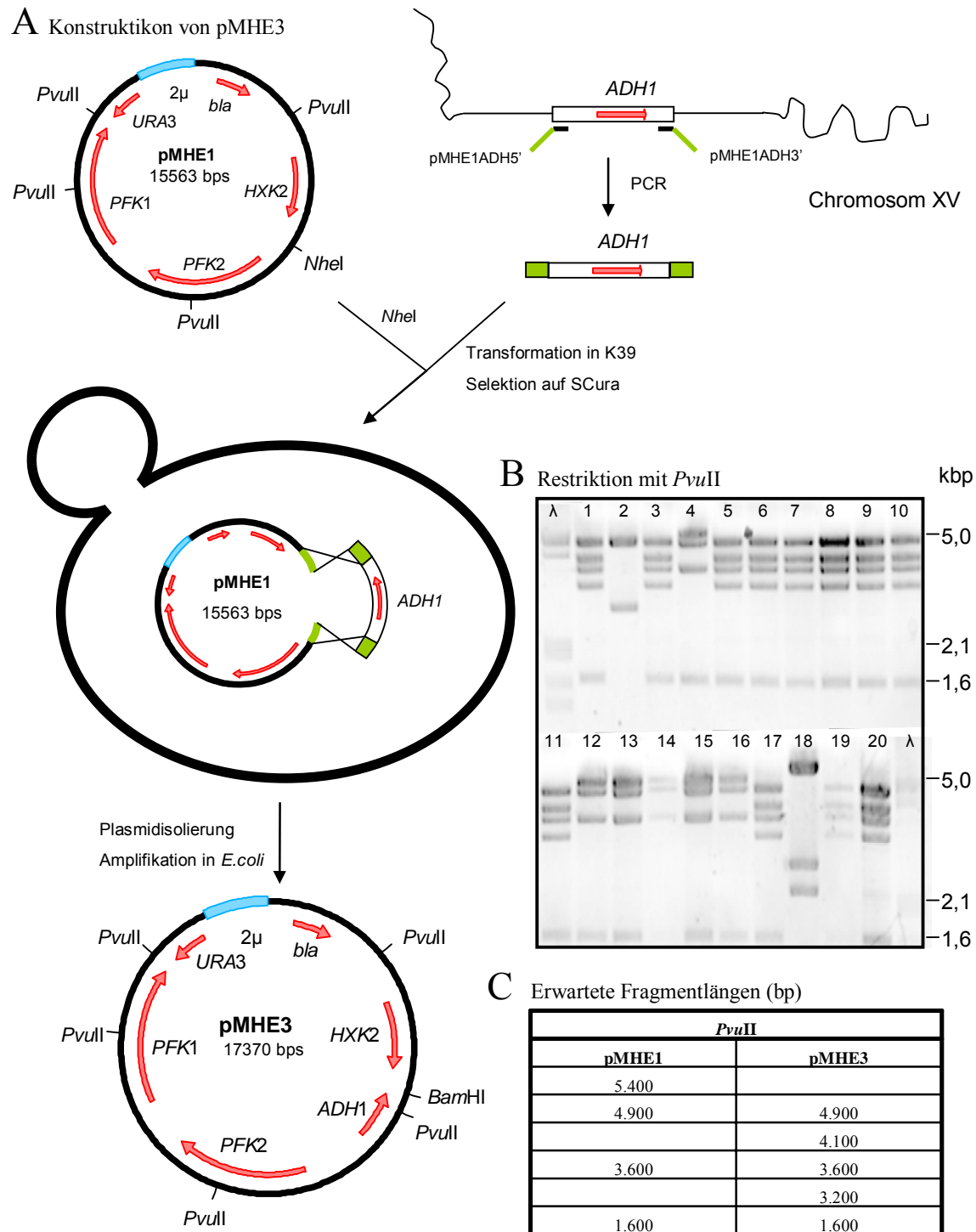
3.1.1.2 Konstruktion von pMHE3

Um auch eine Überproduktion der Alkoholdehydrogenase zu erlauben, wurde *ADHI* in pMHE1 integriert. Dazu wurden die Oligonukleotide pMHE1ADH3' und pMHE1ADH5' zur Amplifikation aus genomischer DNA des Stammes VWH1B in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Damit wurde ein Fragment erhalten, das von 769 bp vor dem Translationsstartcodon bis 133 bp hinter dem Translationsstopcodon des *ADHI*-Genes reicht. Eine singuläre *Bam*HI-Erkennungsstelle wurde zwischen den Sequenzen, die zum Empfängerplasmid homolog sind, und denen, die zum *ADHI*-Gen homolog sind, mit pMHE1ADH3' eingefügt. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch *Nhe*I-Restriktion linearisierten Plasmid pMHE1 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht und Transformanten wurden auf Uracil-freiem Medium selektiert (Abb. 3.1.1.2). Hier konnten aus 5 unabhängigen Hefe-Transformanten Plasmide isoliert werden, die in *E. coli* zur Ampicillinresistenz führten. Aus letzteren wurden 23 Plasmidpräparationen durchgeführt. Eine Restriktionsanalyse mit *Pvu*II zeigte in 12 Fällen das für das Ausgangsplasmid pMHE1 erwartete Muster und in 11 Fällen dasjenige für eine erfolgreiche *in vivo*-Rekombination, durch die pMHE3 erhalten wurde (Abb. 3.1.1.2). Aus letzteren wurde ein *E. coli*-Klon ausgewählt, um größere Mengen Plasmid-DNA herzustellen.

3.1.1.3 Konstruktion von pMHE5

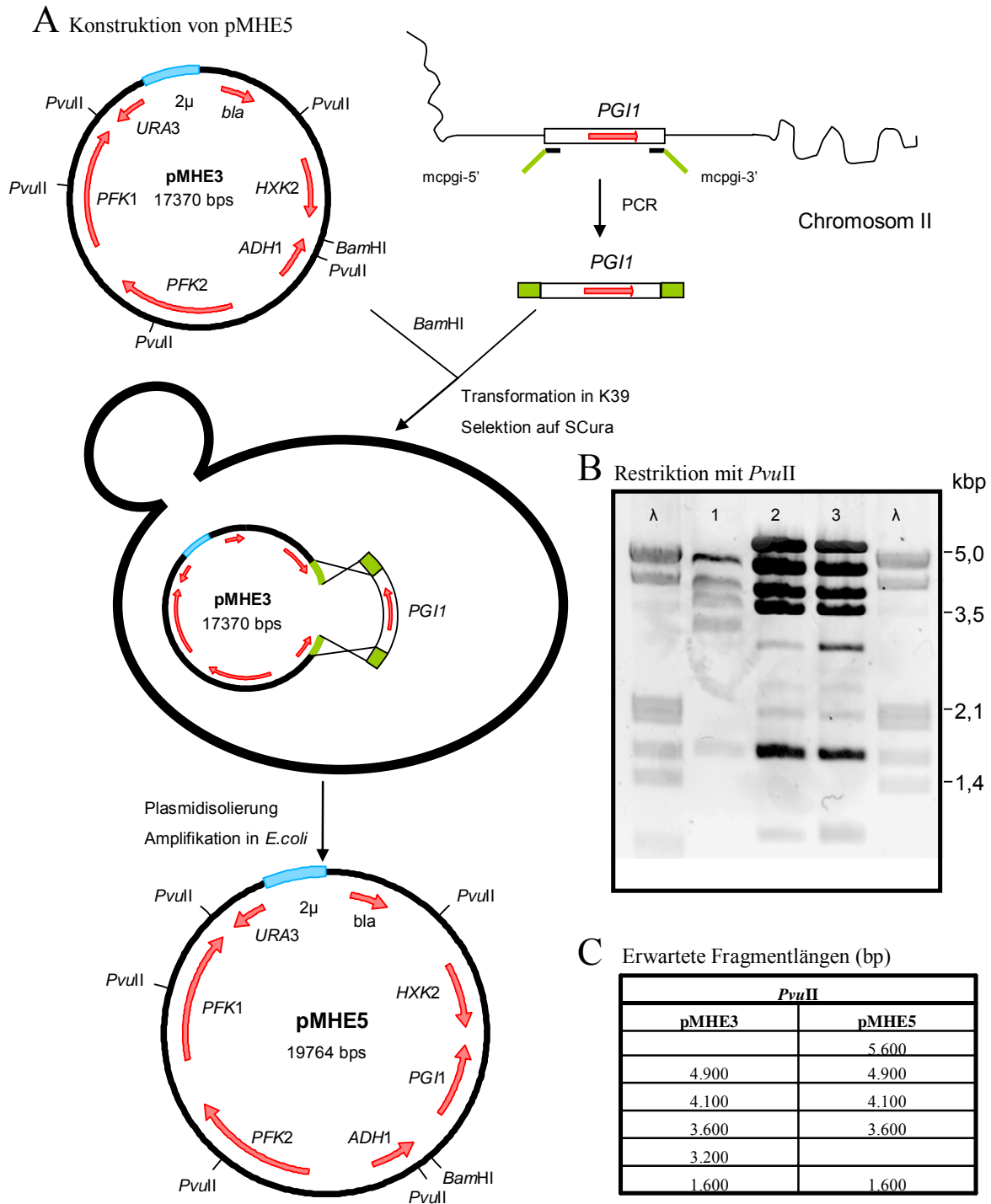
In pMHE3 wurde das für die Phosphoglucose-Isomerase kodierende Gen *PGII* integriert. Dazu wurden die Oligonukleotide mcpgi-5' und mcpgi-3' zur Amplifikation von *PGII* aus genomischer DNA des Stammes VWH1A in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Das erhaltene Fragment reichte von 783 bp 5' des Translationsstartcodons bis 231 bp 3' des Translationsstopcodons von *PGII*. Eine singuläre *Bam*HI-Erkennungsstelle wurde zwischen den Sequenzen, die zum Empfängerplasmid homolog sind, und denen, die zum *PGII*-Gen homolog sind, mit mcpgi-5' eingefügt. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch *Bam*HI-Restriktion linearisierten Plasmid pMHE3 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht und Transformanten wurden auf Uracil-freiem Medium selektiert (Abb. 3.1.1.3). Hier konnten aus zwei unabhängigen Hefe-Transformanten Plasmide isoliert und in *E. coli* unter Selektion auf Ampicillinresistenz eingebracht werden. Aus letzteren wurden 6 Plasmidpräparationen durchgeführt. Nur eines der erhaltenen Plasmide zeigte hier das für pMHE5 erwartete Restriktionsmuster (Abb. 3.1.1.3). Der entsprechende *E. coli*-Klon wurde ausgewählt, um größere Mengen Plasmid-DNA für die weiteren Untersuchungen herzustellen.

Abb. 3.1.1.2 Konstruktion von pMHE3



Integration von *ADH1* in pMHE1. A: Ausgangsplasmid pMHE1 wurde linearisiert mit *NheI*. Durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden pMHE1ADH3' und pMHE1ADH5' entstand ein PCR-Produkt mit *ADH1*. Nach Cotransformation des linearisierten pMHE1 und des PCR-Produkts entstand pMHE3 durch homologe Rekombination in der Hefezelle. Nach Isolation und Amplifizierung in *E. coli* lag pMHE3 vor. B: Restriktionsanalyse von Plasmidisolationen aus *E. coli*: 1-3, 4, 5-11, 12-16, 17-20 sind je aus einer Hefetransformante hervorgegangen, als Standard diente λ -DNA (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktion aus B.

Abb. 3.1.1.3 Konstruktion von pMHE5



Integration von *PGII* in pMHE3. A: Ausgangsplasmid pMHE3 wurde linearisiert mit *BamHI*. Durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *mcpgi3'* und *mcpgi5'* entstand ein PCR-Produkt mit *PGII*. Nach Cotransformation des linearisierten pMHE3 und des PCR-Produkts entstand pMHE5 durch homologe Rekombination in der Hefezelle. Nach Isolation und Amplifizierung in *E. coli* lag pMHE5 vor. B: Restriktionsanalyse von Plasmidisolierungen aus *E. coli* (2, 3), die je aus einer Hefetransformante hervorgegangen sind, von pMHE3 (1) und dem Standard aus λ -DNA (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktion aus B.

3.1.1.4 Konstruktion von pMHE7

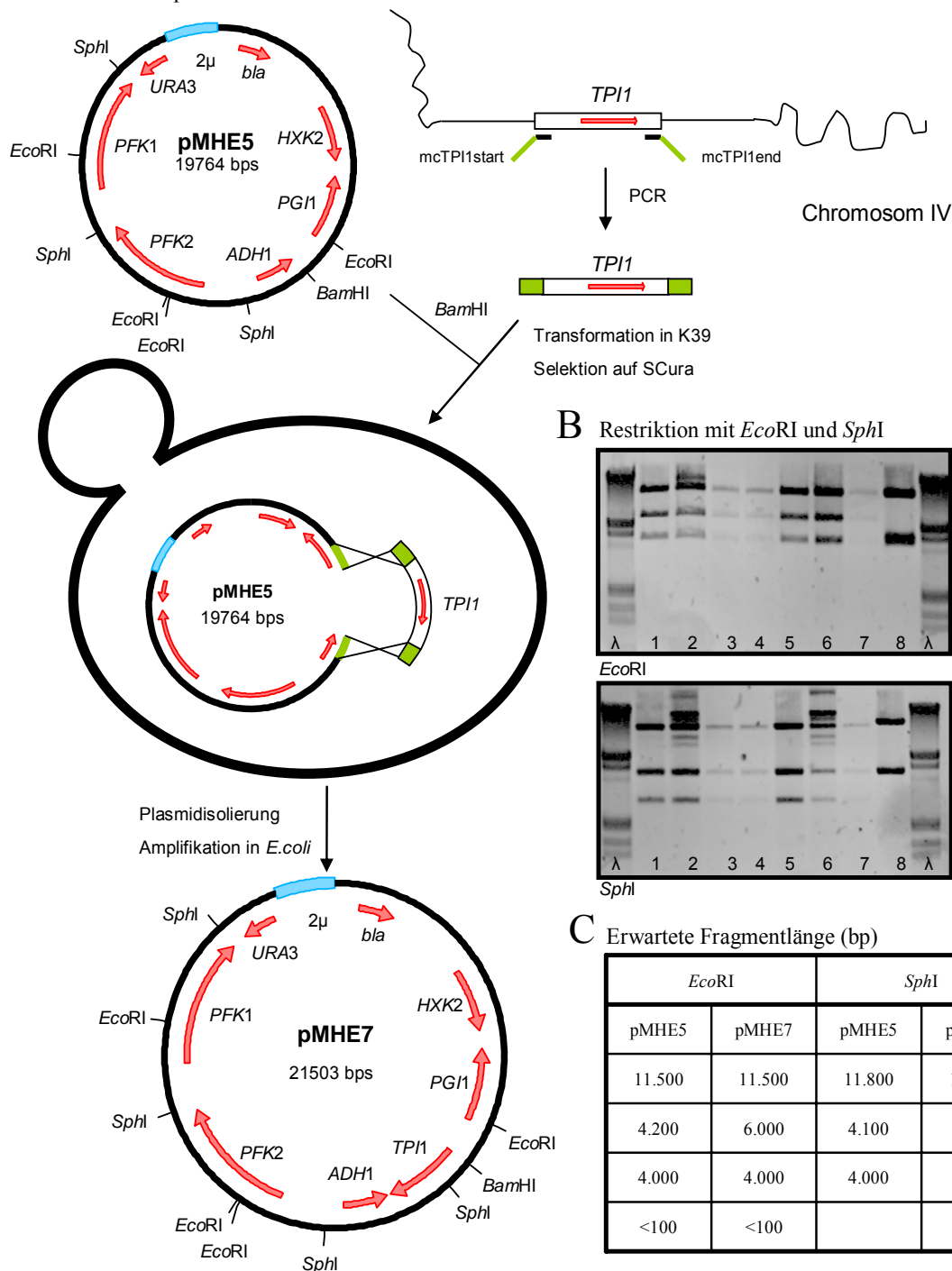
Die Triosephosphat-Isomerase ist in *S. cerevisiae* auf *TPII* kodiert und wurde in pMHE5 zwischen *PGII* und *ADHI* eingefügt. Dazu dienten die Oligonukleotide mcTPIIstart und mcTPIIend zur Amplifikation aus genomischer DNA des Stammes Y23336Δpgi in einer PCR-Reaktion. Das erhaltene Fragment reichte von 810 bp 5' des Translationsstartcodons bis 183 bp 3' des Translationsstopcodons von *TPII*. Mit mcTPIIstart wurde eine singuläre *Bam*HI-Erkennungsstelle zwischen den zum Empfängerplasmid und zum *TPII*-Gen homologen Sequenzen eingefügt. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch *Bam*HI-Restriktion linearisierten Plasmid pMHE5 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht und Transformanten wurden auf Uracil-freiem Medium selektiert (Abb. 3.1.1.4). Hier konnten aus 5 unabhängigen Hefe-Transformanten Plasmide isoliert und in *E. coli* unter Selektion auf Ampicillinresistenz eingebracht werden. Aus 7 *E. coli*-Klonen wurden wiederum Plasmidpräparationen durchgeführt. Davon waren 5 Plasmide in einer Restriktionsanalyse eindeutig als pMHE7 zu identifizieren (Abb. 3.1.1.4). Ein entsprechender *E. coli*-Klon wurde zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA gewählt.

3.1.1.5 Konstruktion von pMHE2

Wie anfangs bereits erwähnt, basieren die geradzahligen pMHE-Konstrukte auf YEp351 (*LEU2*). Als Empfängerplasmid des *PDC1*-Gens für eine *in vivo*-Rekombination diente das aus YEp351 hervorgegangene Plasmid pJJH543, das mit *Bam*HI linearisiert wurde (Abb. 3.1.1.5). Die für die Pyruvat-Decarboxylase kodierende *PDC1*-Sequenz wurde aus dem Plasmid pJJH87 in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden M13reverse und PDC1endADHpc amplifiziert. Das erhaltene Fragment trägt genomische Sequenzen von 856 bp 5' des Translationsstartcodons bis 146 bp 3' des Translationsstopcodons von *PDC1*. 27 bp der *lacZ*-Sequenz der Vektoren pJJH87 und pJJH543 sind dabei an einem Ende homolog. Am anderen Ende des Fragmentes wurde durch PDC1endADHpc eine *Bam*HI-Erkennungsstelle und eine 48 bp lange homologe Sequenz eingefügt. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch *Bam*HI-Restriktion linearisierten Plasmid pJJH543 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht und Transformanten wurden auf Leucin-freiem Medium selektiert (Abb. 3.1.1.5). Aus 3 unabhängigen Hefe-Transformanten konnten Plasmide isoliert und in *E. coli* unter Selektion auf Ampicillinresistenz eingebracht werden. Nach Plasmidisolierung entsprachen alle drei in einer Restriktionsanalyse dem gesuchten pMHE2 (Abb. 3.1.1.5). Aus einem entsprechenden *E. coli*-Klon wurden größere Mengen Plasmid-DNA hergestellt.

Abb. 3.1.1.4 Konstruktion von pMHE7

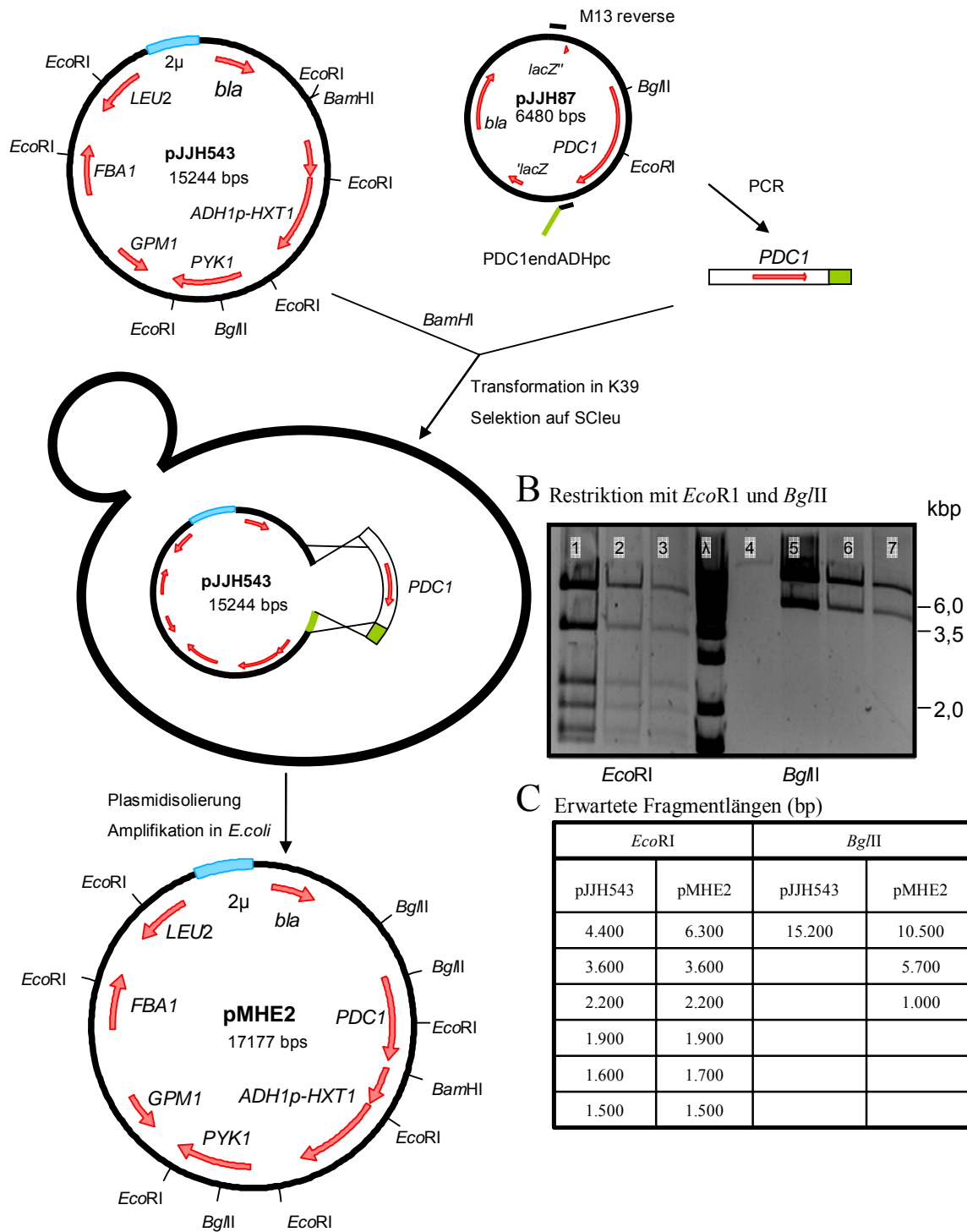
A Konstruktion von pMHE7



Insertion von *TPI1* in pMHE5. A: Ausgangsplasmid pMHE5 wurde mit *BamHI* linearisiert und cotransformiert mit dem PCR-Produkt aus *TPI1* mit den Oligonukleotiden mcTPIstart und mcTPIend. In der Hefezelle erfolgte homologe Rekombination zu pMHE7, das nach Plasmidisolierung und Amplifizierung in *E. coli* vorlag. B: Restriktionsanalyse von Plasmidisolierungen aus *E. coli* mit *EcoRI* und *SphI*. Die Plasmidisolierungen stammen von 5 unterschiedlichen Hefetransformante (1, 2-4, 5, 6, 7) ab und zeigen das für pMHE7 erwartete Restriktionsmuster im Vergleich zu Kontrolle pMHE5 (8) und λ -DNA als Standard (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktionen aus B.

Abb. 3.1.1.5 Konstruktion von pMHE2

A Konstruktion von pMHE2



Insertion von *PDC1* in pJJH543. A: Ausgangsplasmid pJJH543 wurde mit *BamHI* linearisiert. Aus pJJH87 wurde *PDC1* mit den Oligonukleotiden PDC1endADHpc und M13reverse in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Auf die Cotransformation in K39 folgte homologe Rekombination in der Hefezelle. Nach Plasmidisolierung aus 3 unabhängigen Hefekolonien und Amplifizierung in *E. coli* lag pMHE2 vor. B: Restriktionsanalyse von pMHE2 mit *EcoRI* (1-3) und *BglII* (5-7), pJJH543 mit *BglII* (4) und λ -DNA als Standard (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktionen aus B.

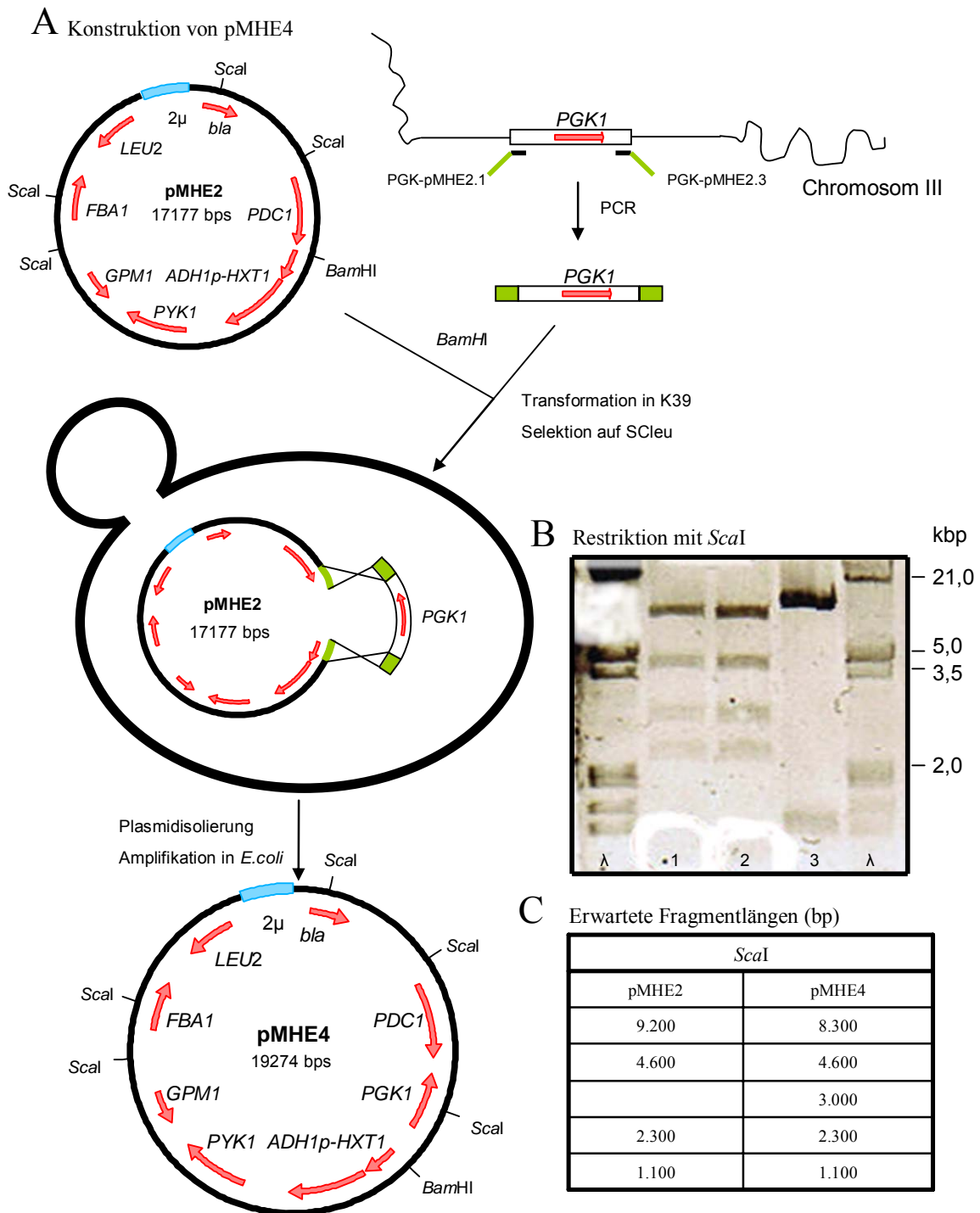
3.1.1.6 Konstruktion von pMHE4

Zur Klonierung des für die Phosphoglycerat-Kinase kodierenden *PGKI*-Gens wurden die Oligonukleotide PGK-pMHE2.1 und PGK-pMHE2.3 als PCR-"Primer" verwendet. Im Ansatz wurde genomische DNA des Hefestammes VWH1B verwendet. Das so erhaltene PCR-Produkt enthielt die Sequenz von 662 bp 5' des Translationsstartcodons bis 193 bp 3' des Translationsstopcodons des *PGKI*-Genes und wurde zusammen mit dem durch *Bam*HI-Restriktion linearisierten Plasmid pMHE2 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht, wodurch 3 Transformanten auf Leucin-freiem Medium selektiert werden konnten. Nach Isolierung der enthaltenen Plasmide und ihrer Amplifikation in *E. coli* unter Selektion auf Ampicillinresistenz, wurden sie einer Restriktionsanalyse unterzogen (Abb. 3.1.1.6). Zwei von drei Plasmiden entsprachen dabei in ihrem Restriktionsmuster den Erwartungen für eine erfolgreiche *in vivo*-Rekombination, mit der pMHE4 erhalten werden konnte. Einer dieser *E. coli*-Klone wurde ausgewählt, um größere Mengen Plasmid-DNA für die weiteren Untersuchungen zu präparieren.

3.1.1.7 Konstruktion von pMHE6

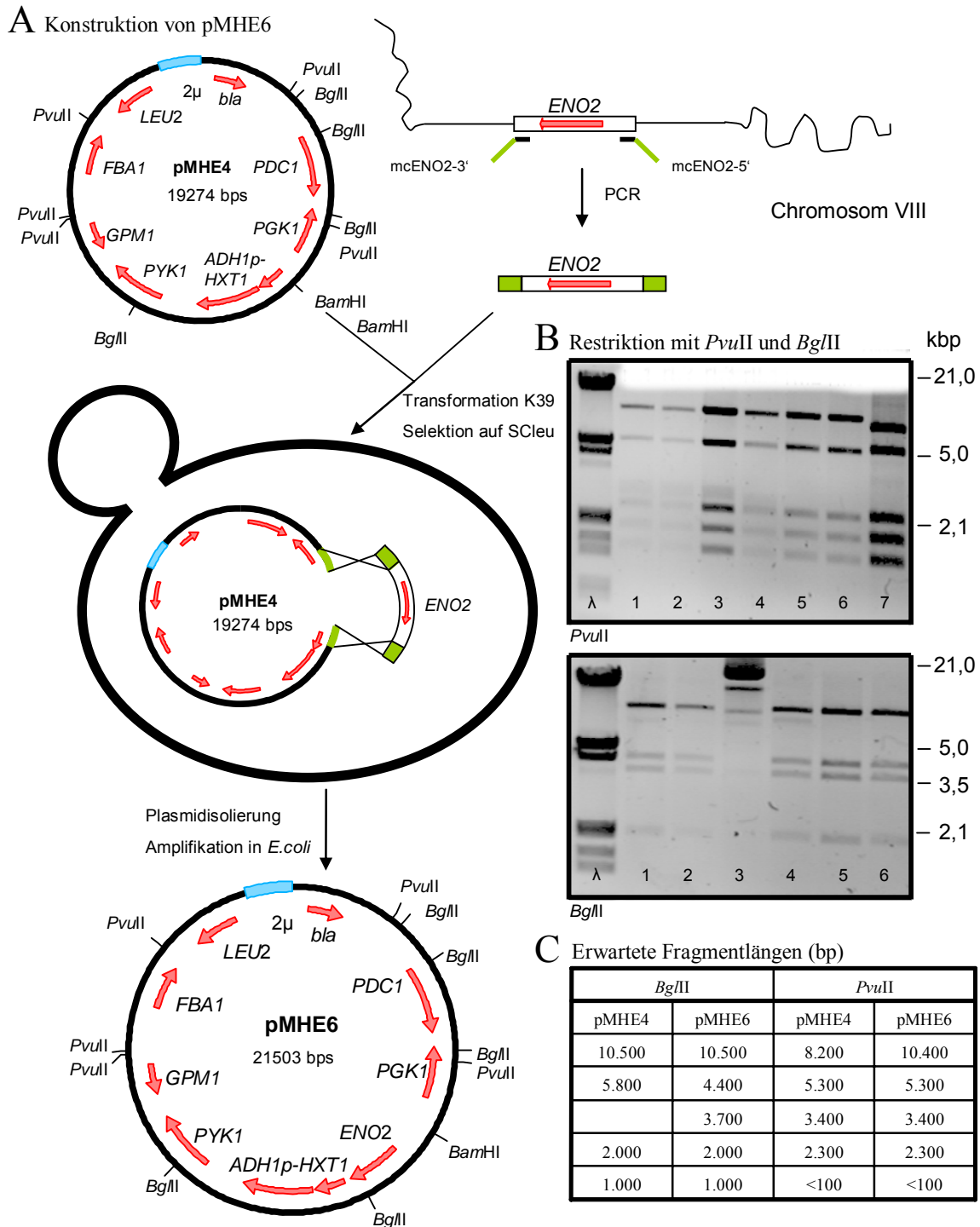
Von den beiden für Enolase kodierenden Hefegenen wurde *ENO2* für die weiteren Konstruktionen ausgewählt, da es das auf Glucose exprimierte Isoenzym kodiert (Cohen *et al.*, 1987). Für die Amplifikation aus genomischer DNA des Hefestammes VWH1A mit Hilfe von PCR wurden die Oligonukleotide mcENO2-5' und mcENO2-3' eingesetzt. Das so erhaltene PCR-Produkt enthielt die Sequenz von 778 bp 5' des Translationsstartcodons bis 155 bp 3' des Translationsstopcodons des *ENO2*-Genes und wurde zusammen mit dem durch *Bam*HI-Restriktion linearisierten Plasmid pMHE4 in den Hefestamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht. Auf Leucin-freiem Medium wurden 2 Transformanten selektiert, aus denen Plasmid isoliert wurde und in *E. coli* unter Selektion auf Ampicillinresistenz amplifiziert wurde. Die aus entsprechenden Einzelkolonien isolierte DNA wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen (Abb. 3.1.1.7). Fünf von sechs Plasmiden zeigten dabei das für pMHE6 erwartete Restriktionsmuster. Einer der entsprechenden *E. coli*-Klone wurde ausgewählt, um größere Mengen Plasmid-DNA für die weiteren Untersuchungen zu präparieren.

Abb. 3.1.1.6 Konstruktion von pMHE4



Insertion von *PGK1* in pMHE2. A: Ausgangsplasmid pMHE2 wurde mit *Bam*HI linearisiert. Mittels einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden PGK-pMHE2.1 und PGK-pMHE2.3 wurde *PGK1* aus genomischer DNA von K39 amplifiziert. Nach Cotransformation entstand durch homologe Rekombination in der Hefezelle pMHE4. Das Plasmid wurde isoliert und in *E. coli* amplifiziert. B: Restriktionsanalyse von Plasmidpräparationen, die von 3 unabhängigen Hefeisolaten (1-3) abstammen, mit *ScaI* im Vergleich zu λ -DNA als Standard (λ). C: Erwartete Fragmentlängen zur Restriktion aus B.

Abb. 3.1.1.7 Konstruktion von pMHE6



Insertion von *ENO2* in pMHE4. A: Ausgangsplasmid pMHE4 wurde mit *BamHI* linearisiert. Mittels einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden mcENO2-5' und mcENO2-3' wurde *ENO2* aus genomischer DNA von K39 amplifiziert. Nach Cotransformation entstand durch homologe Rekombination in der Hefezelle pMHE4. Das Plasmid wurde isoliert und in *E. coli* amplifiziert. B: Restriktionsanalyse von je 3 Klonen aus Hefeisolat 1 (1-3) und Hefeisolat 2 (2-6) sowie pMHE4 (7) mit *PvuII* und *BglII* gegen Standard aus λ -DNA (λ). Die Restriktion mit *PvuII* lieferte statt der erwarteten 3.400bp 2 Fragmente mit 1.900bp und 1.500bp, was eine zusätzliche unbekannte *PvuII*-Schnittstelle in *PDC1* bedeutet. C: Erwartete Fragmentlängen zur Restriktion aus B.

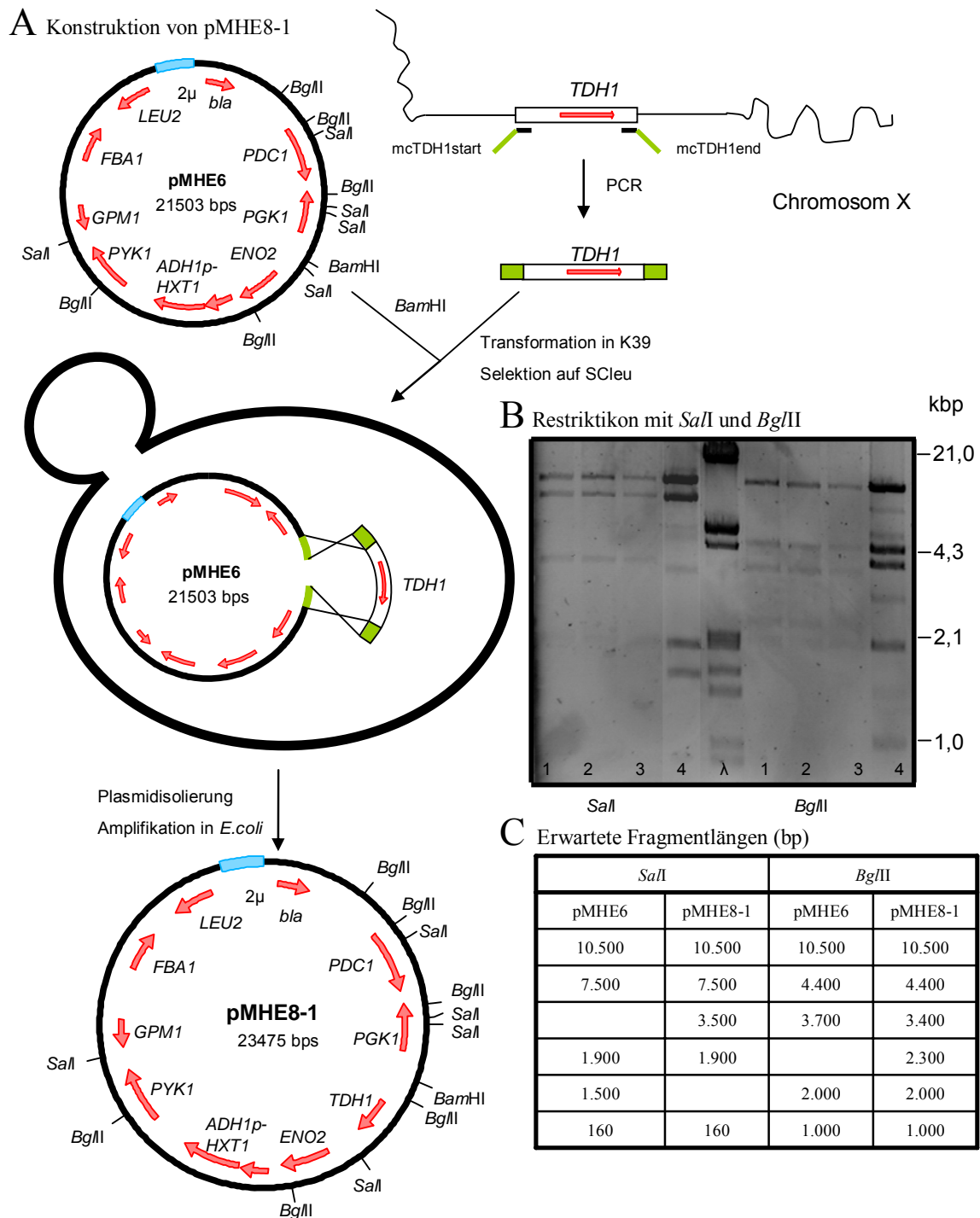
3.1.1.8 Konstruktion von pMHE8-1

Schließlich sollte auch noch gewährleistet werden, dass die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in Hefe überproduziert wird. Von den drei zur Verfügung stehenden Genen (*TDH1*, *TDH2*, *TDH3*) wurde zunächst *TDH1* ausgewählt. Analog zu den oben beschriebenen Strategien wurde das Gen mit den flankierenden Sequenzen zunächst als PCR-Fragment amplifiziert. Als Oligonukleotide dienten mcTDH1start und mcTDH1end (Tab. 2.1.3.3), mit genomischer DNA des Stammes Y23336 Δ pgi als "template". Auch hier wurde mit mcTDH1start wiederum eine neue singuläre *Bam*HI-Restriktionserkennungsstelle eingeführt. Das Plasmid pMHE6 wurde mit *Bam*HI linearisiert und zusammen mit dem PCR-Produkt, das die Sequenz von 775 bp 5' des Translationsstartcodons bis 203 bp 3' des Translationsstopcodons des *TDH1*-Genes enthielt, in den Stamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht. Nach Selektion auf Leucin-freiem Medium konnten 3 Hefe-Tranformanten erhalten werden, deren Plasmide isoliert und in *E. coli* amplifiziert wurden. Zwei von acht Klonen zeigten das für pMHE8-1 erwartete Restriktionsmuster (Abb. 3.1.1.8). Einer der entsprechenden *E. coli*-Klone wurde ausgewählt, um größere Mengen Plasmid-DNA für die weiteren Untersuchungen zu präparieren.

3.1.1.9 Konstruktion von pMHE8-3

Die weitere Verwendung von pMHE8-1 ergab, dass damit keine erhöhte spezifische Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu erreichen war (Tab. 3.2.1). Das *TDH1*-Gen ist das am schwächsten exprimierte *TDH*-Gen (McAllister und Holland, 1985), und außerdem deuten neuere Daten darauf hin, dass *TDH1* durch reduktiven Stress induziert zu sein scheint (Valadi *et al.*, 2004), wohingegen *TDH2* und *TDH3* konstitutiv exprimiert werden. Da für *TDH3* noch keine Anzeichen für deutliche Überproduktion aus der Literatur bekannt sind (Hauf *et al.*, 2000), sollte *TDH2* für die Überexpressionsversuche herangezogen werden. Ausgehend von pMHE6 wurde diesmal durch Restriktion und Ligation eine zuvor sequenzierte Kopie des *TDH2*-Gens eingebracht. Dieses wurde als *Bgl*II-Fragment aus pMHE11 erhalten (vgl. Abschnitt 3.1.2.1) und mit dem durch *Bam*HI linearisierten pMHE6 ligiert (Abb. 3.1.1.9). Die Orientierung des *TDH2*-Gens wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *Sal*I bestimmt und die Bezeichnung pMHE8-3 beschreibt das Plasmid, in dem *TDH2* in gleicher Richtung wie *ENO2* und in entgegengesetzter Richtung zu *PGK1* liegt (Abb. 3.1.1.9).

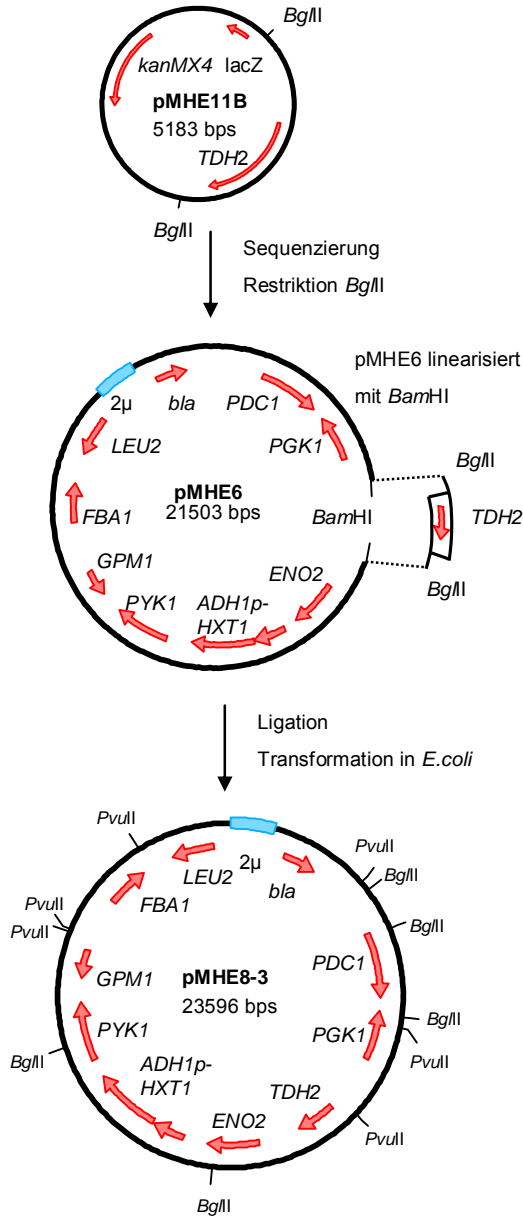
Abb. 3.1.1.8 Konstruktion von pMHE8-1



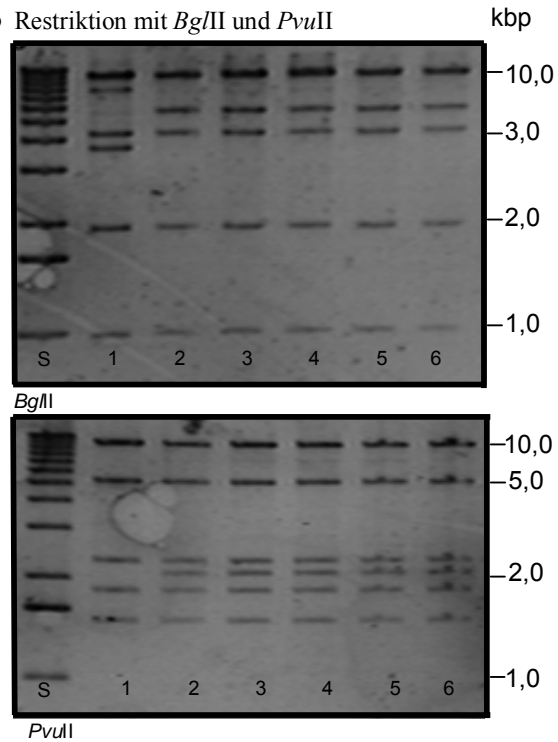
Insertion von *TDH1* in pMHE6. A: Ausgangsplasmid pMHE6 wurde mit *Bam*HI geschnitten und cotransformiert mit dem PCR-Produkt aus *TDH1* mit den Oligonukleotiden mcTDH1start und mcTDH1end. In der Hefezelle erfolgte homologe Rekombination. Nach Plasmidisolierung und Amplifizierung in *E. coli* lag pMHE8-1 vor. B: Restriktionsanalyse von pMHE8-1 mit *SalI* und *BglII*. Jeweils eine Plasmidisolierung aus *E. coli*, die von 3 unabhängigen Hefetransformanten (1, 2, 3) abstammen, und Kontrolle pMHE6 (4) im Vergleich zu λ -DNA als Standard (λ). C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktionen aus B.

Abb. 3.1.1.9 Konstruktion von pMHE8-3

A Konstruktion von pMHE8-3



B Restriktion mit *Bgl*II und *Pvu*II



C Erwartete Fragmentlängen (bp)

	<i>Pvu</i> II		<i>Bgl</i> II	
	pMHE6	pMHE8-3	pMHE6	pMHE8-3
	10.400	10.400	10.500	10.500
	5.300	5.300	4.400	4.400
	3.400	3.400	3.700	3.700
	2.300	2.300		2.300
		2.100	2.000	2.000
	160	160	1.000	1.000

Integration von *TDH2* in pMHE6. A: Nach Restriktion von pMHE11 mit *Bgl*II wurde das Fragment mit *TDH2* mit pMHE6, das zuvor mit *Bam*HI linearisiert wurde, ligiert. Nach Transformation in *E. coli* und Selektion auf Ampicillin wurde das Plasmid pMHE8-3 isoliert. B: Restriktionsanalyse von 5 unabhängigen Plasmid-Isolierungen von pMHE8-3 (2-6) und von pMHE6 (1) mit *Pvu*II und *Bgl*II mit 1kb-Standard (S). Die *Bgl*II-Restriktion lieferte nicht die erwarteten Fragmente 3.700bp und 2.300bp, sondern ein Fragment mit 6.000bp. Scheinbar ging eine Schnittstelle verloren. Die Restriktion mit *Pvu*II ergab wie bereits bei pMHE6 statt der erwarteten 3.400bp 2 Fragmente mit 1.900bp und 1.500bp. C: Erwartete Fragmentlängen für die Restriktionen aus B.

3.1.1.10 Konstruktion von pMHE22

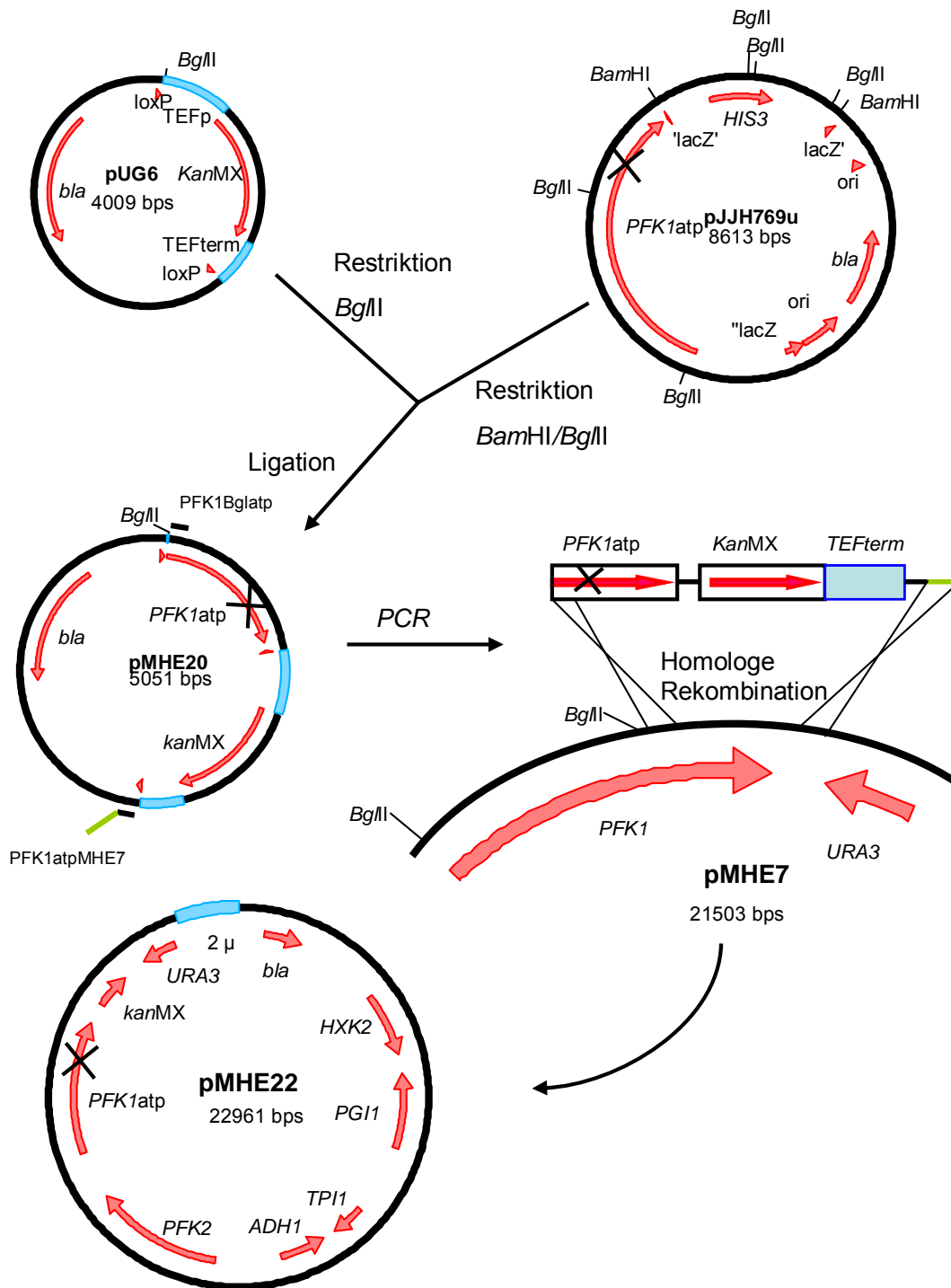
Neben der bisher beschriebenen Konstruktion von Plasmiden, die die für die genannten Enzyme kodierenden Wildtyp-Gene auf Hochkopienzahl-Vektoren tragen, sollte im Weiteren auch versucht werden, eine Phosphofruktokinase mit veränderten allosterischen Eigenschaften zur Überproduktion zu bringen. Die in diesem Zusammenhang beschriebenen Experimente wurden zusammen mit Daniela Pulganow im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit durchgeführt. Im Gegensatz zu der oben eingehaltenen Nomenklatur leitet sich das darin hergestellte Plasmid pMHE22, obwohl geradzahlig, vom Basisvektor YEp352 (*URA3*) ab. Es entspricht in der Zusammensetzung der eingesetzten Hefegene dem Plasmid pMHE7 (vgl. Abschnitt 3.1.1.4), mit dem Unterschied, dass das eingesetzte *PFKI*-Allel eine Punktmutation trägt, die zu einem Aminosäureaustausch (Prolin 728 → Leucin) in der kodierten alpha-Untereinheit der Phosphofruktokinase führt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass damit *in vivo* eine heterooktamere Phosphofruktokinase gebildet wird, die nicht mehr der allosterischen Hemmung durch ATP unterliegt (Rodicio *et al.*, 1984). Im Zuge der Konstruktion, die in Abb. 3.1.1.10 dargestellt ist, wurde dabei eine *kanMX*-Resistenzkassette in das Plasmid eingebracht. Ausserdem zeigte die Sequenzierung, dass zusätzliche Mutationen durch die PCR-Reaktionen auftraten (vgl. Abschnitt 3.1.2.3).

Alle bis hierher beschriebenen Plasmide wurden im zweiten Teil der Arbeit eingesetzt, um die Expression der enthaltenen Gene *in vivo* zu untersuchen und eventuelle Auswirkungen auf Wachstum und Physiologie entsprechender Transformanten zu bestimmen.

3.1.2 Konstruktionen zur Sequenzierung relevanter Bereiche der erhaltenen Plasmide

Im Fall der *TDH*-Gene führte die Expression von einem Hochkopienzahl-Vektor nicht zu der erwarteten Steigerung in der spezifischen Enzymaktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Darüber hinaus war es mit der vorhandenen technischen Ausrüstung nicht möglich, Glucose-Transportmessungen durchzuführen, um die Auswirkungen der Überexpression des *HXT1*-Gens zu bestimmen. In einem ersten Schritt musste daher sichergestellt werden, dass in den entsprechenden Genen keine gravierenden Basensubstitutionen durch die verwendete PCR-Technik aufgetreten waren, die zu einem Funktionsverlust in den kodierten Proteinen führen könnten.

Abb. 3.1.1.10 Konstruktion von pMHE22



Ersetzen von *PFK1* in pMHE7 durch *PFK1_{atp}*. Aus pJH769u (Tab. 2.1.3.2) wurde *PFK1_{atp}* als *BamHI/BglII*-Fragment mit pUG6, der zuvor mit *BglII* geschnitten wurde, zu pMHE20 ligiert. Durch eine PCR-Reaktion mit pMHE20 und den Oligonukleotiden *PFK1Bglatp* und *PFK1atpMHE7* entstand ein PCR-Produkt, das auf der einen Seite in der *PFK1*-Sequenz und auf der anderen Seite mit pMHE7 homolog war. Über Homologe Rekombination in Hefe entstand pMHE22. In der Bachelorarbeit von Daniela Palgunow (2004) wurde die richtigen Klone durch die zusätzliche *KpnI*-Erkennungsstelle in *PFK1_{atp}* identifiziert. Die richtige Sequenz der für *PFK1_{atp}* spezifischen Stelle wurde durch die Konstruktion von pMHE41 und anschließender Sequenzierung bestätigt (vgl. Abschnitt 3.1.2.3).

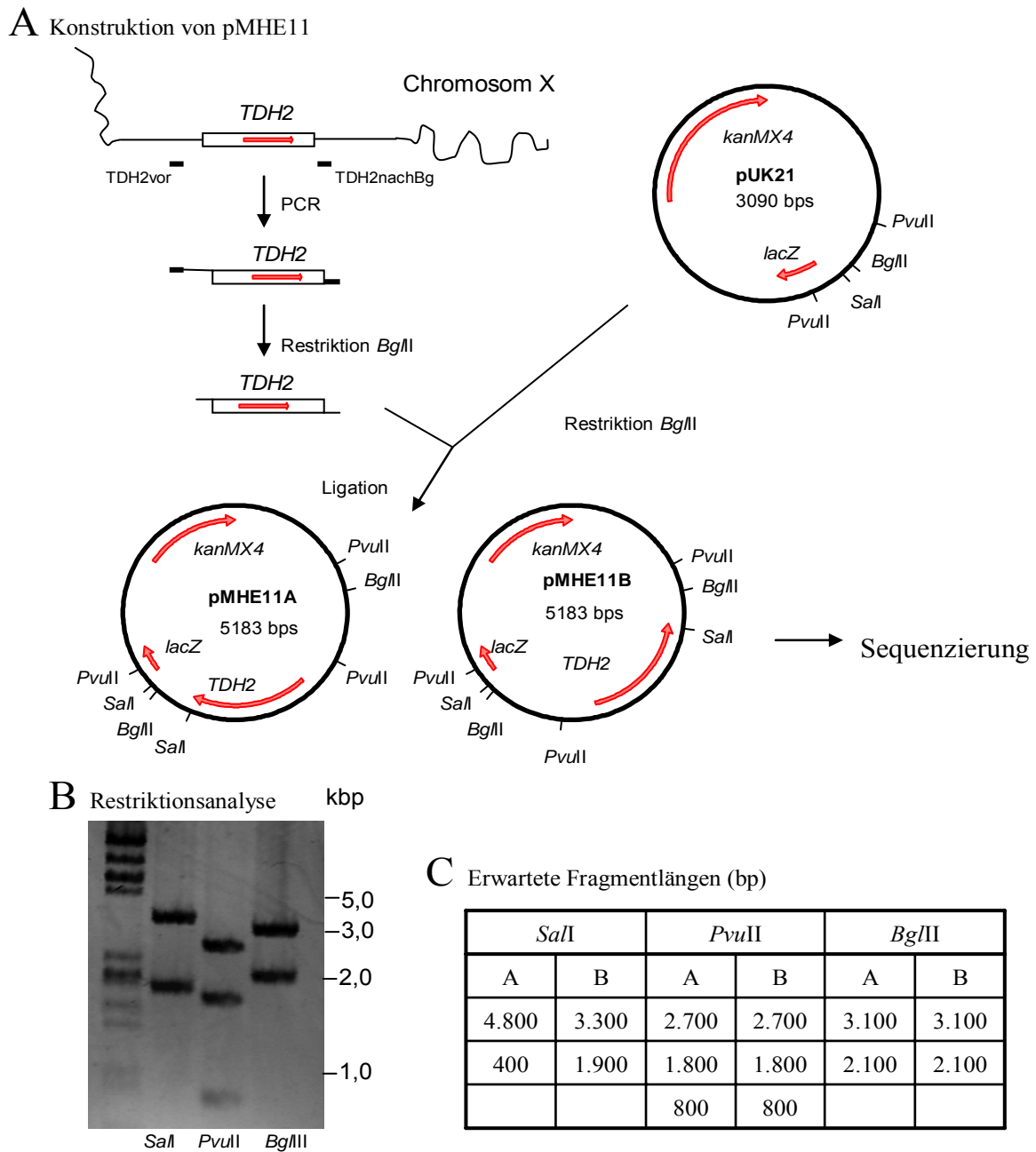
3.1.2.1 Konstruktion und Sequenzierung von pMHE11 (*TDH2*)

Da *TDH2* als letztes Gen der geradzahligen Serie von pMHE-Plasmiden eingebaut werden sollte, wurde hier darauf verzichtet, eine weitere singuläre *Bam*HI-Erkennungsstelle einzusetzen. Vielmehr sollte die korrekte Sequenz sichergestellt werden, weshalb das mit den Oligonukleotiden TDH2vor und TDH2nachBg aus genomischer DNA des Hefestammes K39 erhaltene PCR-Produkt zunächst mit *Bg*II behandelt und in pUK21 ligiert wurde. Das so erhaltene Konstrukt wurde als pMHE11 bezeichnet (Abb. 3.1.2.1) und die Insertion mit Standardprimern sequenziert. Ein Vergleich mit der genomischen *TDH2*-Sequenz ergab keinerlei Basenaustausche. Daher konnte das Plasmid zur Herstellung von pMHE8-3 (vgl. Abschnitt 3.1.1.9) verwendet werden. Die ermittelten Sequenzen von *TDH2* sind Anhang I zu entnehmen.

3.1.2.2 Konstruktion und Sequenzierung von pMHE30 (*HXT1*)

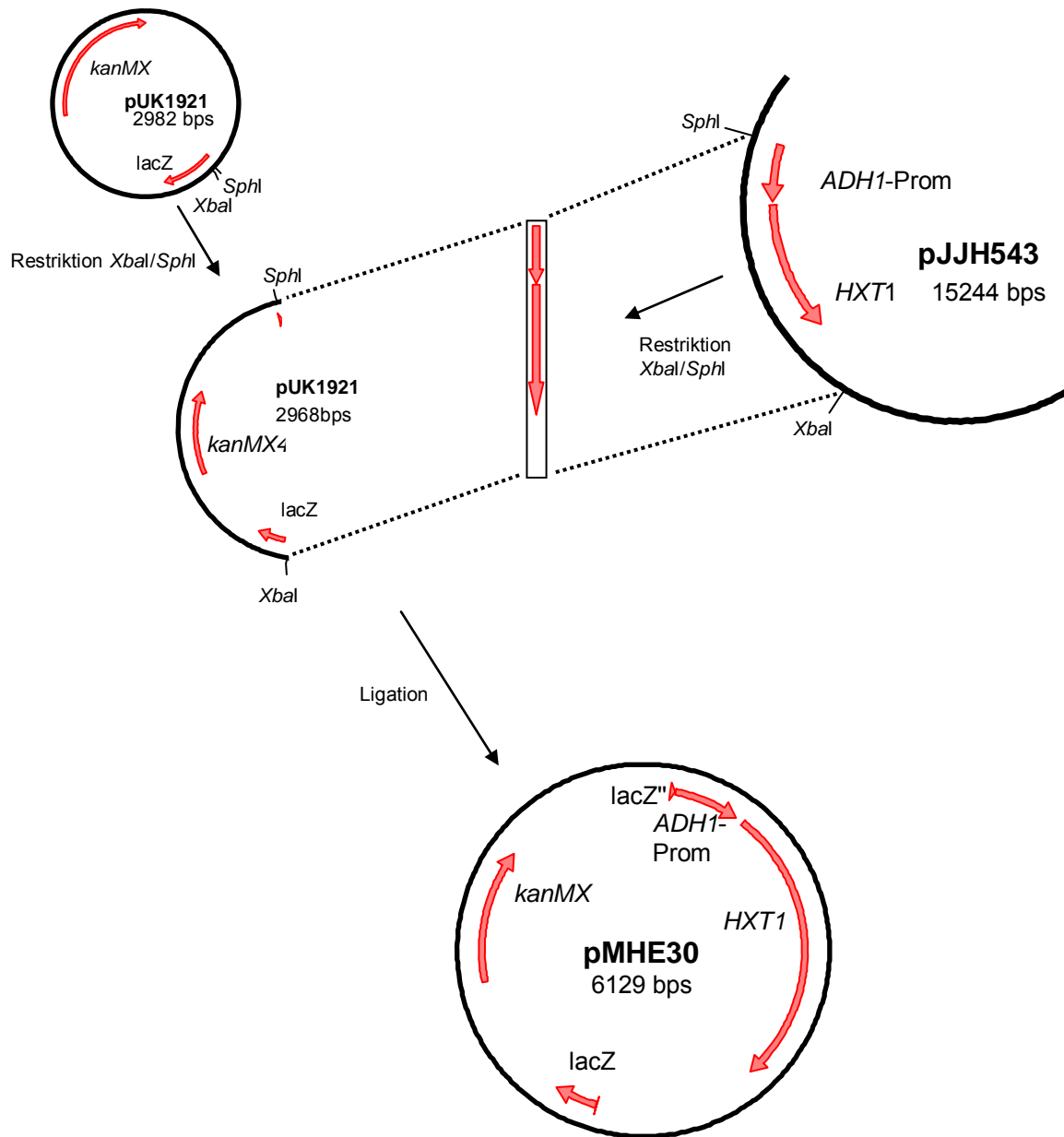
Die Sequenzierung bestimmter Bereiche von großen Plasmiden hat sich in der Vergangenheit als schwierig erwiesen. Deshalb wurde hier die Strategie verfolgt, entsprechende Fragmente aus den Hochkopienzahl-Vektoren in kleinere Sequenziervektoren einzusetzen. Um durch die PCR-Synthese verursachte Basenaustausche in der kodierenden Sequenz des von *HXT1* kodierten Hexosetransporters auszuschließen, wurde das 3,2 kb lange *Sph*I/*Xba*I-Fragment mit diesem Bereich aus dem Ausgangsplasmid pJH543 in den Sequenziervektor pUK1921 eingesetzt (Abb. 3.1.2.2). Die Sequenzierung ergab insgesamt vier Basenaustausche zu der aus der Datenbank erhaltenen Wildtyp-Sequenz. Drei dieser Austausch (A177G, A795G, T1128C; jeweils gezählt von dem Translationsstartcodon) führten zu keiner Veränderung in der Primärsequenz des kodierten Proteins. Der Austausch T1135C dagegen verändert die kodierende Sequenz so, dass im daraus abgeleiteten Protein ein Tyrosinrest (379) durch ein Histidin ersetzt wird. Nach Strukturvorhersagen ist diese Position Teil einer transmembranen Domäne des Glucosetransporters, sodass in weiteren Experimenten gezeigt wurde, dass auch das veränderte Protein noch eine Transportfunktion ausüben kann (vgl. Abschnitt 3.2.5). Die ermittelten Sequenzen für *HXT1* sind Anhang II zu entnehmen.

Abb. 3.1.2.1 Konstruktion von pMHE11



Klonierung von *TDH2* in pUK21. A: *TDH2* wurde mit den Oligonukleotiden TDH2vor und TDH2nachBg aus genomischer DNA von K39 amplifiziert und mit *BglII* geschnitten. Das Empfängerplasmid pUK21 wurde ebenfalls *BglII* geschnitten, und nach Isolierung der Fragmente aus einem Agarosegel entstand durch Ligation pMHE11. Die beiden möglichen Orientierungen wurden pMHE11A und pMHE11B genannt. In dieser Arbeit wurde nur mit pMHE11B weitergearbeitet und die Bezeichnung pMHE11 bezieht sich immer auf die Orientierung von pMHE11B. Das Plasmid wurde zur Sequenzierung mit den Primern M13Forward und M13Reverse (vgl. Anhang I) und zur Konstruktion von pMHE8-3 (vgl. Abschnitt 3.1.1.9) verwendet. B: Restriktionsanalyse des Ligationsproduktes mit *SalI*, *PvuII* und *BgIII*. Die Fragmentlängen identifizieren pMHE11B. C: Erwartete Fragmentlängen für beide möglichen Orientierungen (A und B) des *TDH2*-Fragmentes.

Abb. 3.1.2.2 Konstruktion von pMHE30

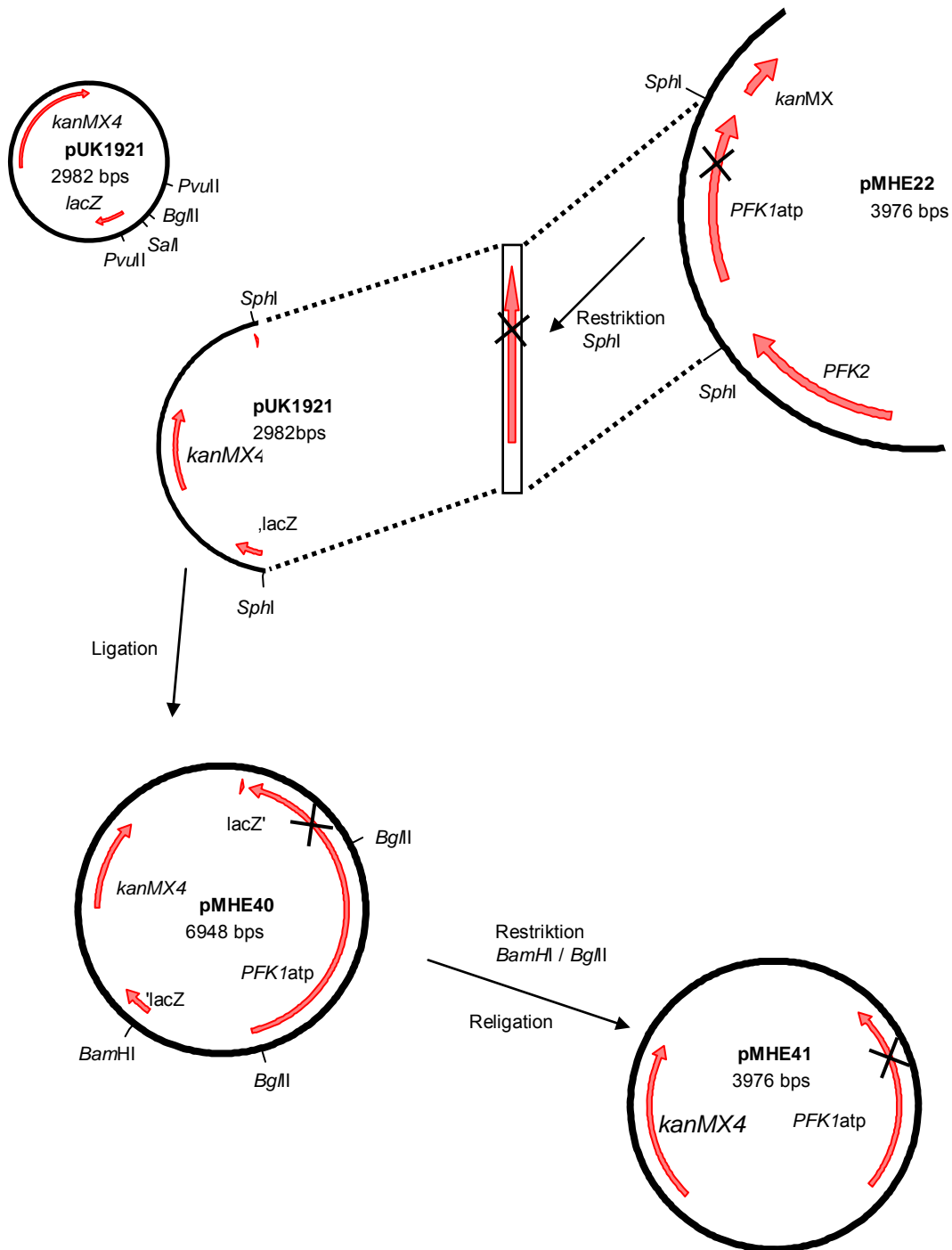


Subklonierung von *HXT1* in pUK1921. pJJH543 und pUK21 wurden mit *XbaI/SphI* linearisiert und über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt. Das erhaltene *HXT1*-Fragment wurde in das pUK21-Fragment ligiert, woraus pMHE30 entstand. Das Plasmid wurde mit den Oligonukleotiden HXTseq1, HXTseq2, HXTseq3 und HXTseq4 sequenziert (vgl. Anhang II).

3.1.2.3 Konstruktion und Sequenzierung von pMHE41 (*PFKI_{atp}*)

In einem weiteren Versuch sollte das Wildtyp-Allel von *PFKI*, das für die alpha-Untereinheit der Phosphofruktokinase in Hefe kodiert, in den Überexpressionsplasmiden durch das *PFKI_{atp}*-Allel ersetzt werden. Dies führt *in vivo* zur Bildung eines Enzyms mit veränderten allosterischen Eigenschaften, dessen Aktivität durch ATP nicht mehr gehemmt wird (Rodicio *et al.*, 2000). Auch hierbei wurde wieder die PCR-Technik in Verbindung mit einer *in vivo*-Rekombination eingesetzt, weshalb die Sequenz überprüft wurde. Um dies zu ermöglichen, wurde zunächst ein *SphI*-Fragment aus dem Plasmid pMHE22 (vgl. Abschnitt 3.1.1.10) in pUK1921 eingesetzt, um pMHE40 zu erhalten. Da das gesuchte Fragment mit 3950 bp bei der Isolation aus dem Gel nicht von dem ebenfalls entstandenen 4050bp- Fragment getrennt werden konnte, wurden die durch Ligation erhaltenen Plasmide einer Restriktionsanalyse mit *BglII* unterzogen und die Plasmide mit dem richtigen Fragment identifiziert. Die Orientierung konnte zudem durch die Restriktion mit *EcoRI* bestimmt werden und als pMHE40 wurde das Plasmid bezeichnet, welches das *PFKI_{atp}*-Allel in entgegengesetzter Richtung zu *kanMX* trägt. Dieses wurde durch eine Restriktion mit *BamHI/BglII* und anschließender Ligation noch weiter verkürzt und das so erhaltene Plasmid pMHE41 zur Sequenzierung der verbliebenen *PFKI*-Sequenz herangezogen (Abb. 3.1.2.3). Neben dem für die veränderten allosterischen Eigenschaften verantwortlichen Austausch (Prolin 728 → Leucin) wurden dabei zwei weitere Austausche entdeckt, die sich auf die Primärsequenz des kodierten Proteins auswirken (Glutamat 790 → Lysin und Arginin 824 → Glycin), und wahrscheinlich auf PCR-Fehler zurückzuführen sind. Hier konnte allerdings die Funktionalität des Enzyms durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität und der allosterischen Eigenschaften sichergestellt werden (Tab. 3.2.2). Die ermittelten Sequenzen von *PFKI_{atp}* sind Anhang III zu entnehmen.

Abb. 3.1.2.3 Konstruktion von pMHE41



Subklonierung von *PFK1_{atp}* in pUK1921. pMHE22 und pUK1921 wurden durch Restriktion mit *SphI* linearisiert und über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das aus pMHE22 erhaltene *PFK1_{atp}*-Fragment wurde in pUK1921 ligiert, woraus pMHE40 entstand. Dieser wurde durch Restriktion mit *BamHI/BglII* und anschließender Religation verkürzt zu pMHE41 und mit dem Universalprimer M13R sequenziert (vgl. Anhang III)

3.2 Untersuchungen zur Genexpression *in vivo*

Da für die Konstruktionen der im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Plasmide in den meisten Fällen die PCR-Technik in Verbindung mit *in vivo*-Rekombination verwendet wurde, war es zunächst notwendig, sicherzustellen, dass die für den Glucosestoffwechsel kodierenden Gene keine gravierenden Mutationen enthielten. Darüber hinaus war es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Überproduktion aller plasmidkodierten Proteine zu erreichen. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Konstrukte zunächst in den haploiden *S. cerevisiae*-Stamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht. Wo immer möglich, wurden die spezifischen Enzymaktivitäten in Rohextrakten der unter selektiven Bedingungen angezogenen Transformanten bestimmt. Da der Rezipientenstamm auch jeweils eine genomische Kopie der entsprechenden Gene trägt, wurden Transformanten mit den "Leervektoren" YEp351 (*LEU2*) und YEp352 (*URA3*) als Kontrollen eingesetzt.

Für den Hexosetransporter konnte die Aktivität aus technischen Gründen nicht bestimmt werden. Darüber hinaus zeigten die Konstrukte mit den *TDH*-Genen keine Überproduktion auf der Ebene der spezifischen Enzymaktivitäten (vgl. Abschnitt 3.2.1). In diesen Fällen wurden daher zusätzlich mit Hilfe der "real time RT-PCR" die relativen Transkriptkonzentrationen bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.6).

3.2.1 Enzymatische Bestimmungen im Zuge der Konstruktionen der pMHE-Plasmide

In einem ersten Ansatz wurde nach jeder Klonierung eines weiteren Gens für pMHE1 bis pMHE8 das Plasmid in den Rezipientenstamm eingebracht und die spezifische Aktivität des kodierten Enzyms bestimmt (Tab. 3.2.1). Da die Ausgangsplasmide pJJH542 (*HXK2*, *PFK1*, *PFK2*) und pJJH543 (*ADH1pHXT1*, *FBA1*, *GPM1*, *PYK1*) bereits einige Glykolysegene enthielten, sollte zunächst festgestellt werden, ob damit bereits eine Erhöhung der entsprechenden spezifischen Aktivitäten zu erreichen ist. Wie aus Tab. 3.2.1 ersichtlich wird, zeigten Transformanten mit diesen Plasmiden im Vergleich zu den Kontrollen eine um den Faktor 9 erhöhte spezifische Aktivität für die Phosphofruktokinase (Pfk). Die Aktivitäten für die Aldolase (Fba) und die Phosphoglyceratmutase (Gpm) waren um das 4,8- bzw. 2,7-fache gegenüber der Kontrolle erhöht. Lediglich für die Hexokinase (Hxk) konnte keine Steigerung der spezifischen Enzymaktivität beobachtet werden (die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase wurde erst mit dem Folgekonstrukt pMHE6 bestimmt, wo sie um den Faktor 2,6 höhere Werte ergab als die Kontrolle).

Tab. 3.2.1 Spezifische Enzymaktivitäten [mU/mg Protein] in Rohextrakten aus Transformanten des Hefestammes K39 mit den angegebenen Konstrukten

Plasmid	Enzym ¹	Spezifische Aktivität ²		
		Kontrolle ³	Transformante	Faktor ⁴
pJJH542	Hexokinase (Hxk)	1022	947	0,9
	Phosphofruktokinase (Pfk)	277	2498	9,0
pJJH543	Aldolase (Fba)	677	3273	4,8
	Phosphoglyceratmutase (Gpm)	1589	4251	2,7
	Pyruvatkinase (Pyk)	4905	19305	3,9
pMHE2	Pyruvatdecarboxylase (Pdc)	149	222	1,5
pMHE3	Alkoholdehydrogenase (Adh)	331	2322	7,0
pMHE4	Phosphoglyceratkinase (Pgc)	3689	9197	2,5
pMHE5	Hexokinase (Hxk)	757	2437	3,2
	Phosphoglucoseisomerase (Pgi)	1709	2871	1,7
pMHE6	Enolase (Eno)	1137	2778	2,4
pMHE7	Triosephosphatisomerase (Tpi)	1851	47396	25,6
pMHE8-1	Triosephosphatdehydrogenase (Tdh)	850	775	0,9
pMHE8-3	Triosephosphatdehydrogenase (Tdh)	1730	1989	1,1

Die Transformanten wurden in selektiven Mangelmedien mit 2% Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen und zur Herstellung der Rohextrakte verwendet, wie in Material und Methoden angegeben.

¹ Angegeben sind die Trivialnamen der jeweiligen Enzyme, mit den im Text verwendeten Abkürzungen in Klammern.

² Die spezifischen Aktivitäten von aus verschiedenen Experimenten erhaltenen Rohextrakten zeigten erhebliche Schwankungen. Daher sind hier für jedes Enzym die Daten angegeben, die im gleichen Experiment mit der jeweiligen Kontrolle bestimmt wurden. Mehrfachbestimmungen der spezifischen Aktivitäten aus einem Rohextrakt wichen i.d.R. nicht mehr als 15% voneinander ab.

³ Als Kontrollen wurden Rohextrakte aus Transformanten des Stammes K39 verwendet, die die "Leervektoren" YEp351 bzw. YEp352 enthielten.

⁴ Der Faktor der Überproduktion errechnet sich aus dem Quotienten der für die Transformanten erhaltenen Werte mit dem der im jeweiligen parallelen Enzymtest eingesetzten Kontrolle.

Wie aus den Werten für die Triosephosphat-Dehydrogenase (Tdh) zu erkennen ist, unterschieden sich die spezifischen Enzymaktivitäten bereits im Wildtyp zwischen verschiedenen Bestimmungen um den Faktor 2,5. Ähnliches konnte auch für die anderen Enzyme beobachtet werden. Daher wurde darauf geachtet, in jedem Experiment die Kontrollen unter gleichen Anzuchtbedingungen zu erhalten, um einen direkten Vergleich zu erlauben.

In diesem Zusammenhang wurde auch deutlich, dass weder mit dem *TDH1*-Gen (pMHE8-1), noch mit dem *TDH2*-Gen (pMHE8-3) eine Steigerung der spezifischen GapDH-Aktivität in entsprechenden Transformanten zu erreichen war. Die Gründe dafür wurden in einem späteren Teil der Arbeit näher untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.6).

Für alle anderen Enzyme kann aus den Daten auf eine Überproduktion *in vivo* geschlossen werden. Dabei zeigten die Pyruvatdecarboxylase (Faktor 1,5) und die Phosphoglucoseisomerase (Faktor 1,7) sehr moderate Effekte. Die restlichen Enzyme zeigten in entsprechenden Transformanten mindestens eine Verdopplung der spezifischen Aktivitäten. Bemerkenswert war in diesem Experiment die Triosephosphatisomerase, die eine Steigerung um mehr als das 25-fache (Tab. 3.2.1) ergab.

3.2.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei zunehmender Komplexität der pMHE-Plasmide

Nachdem für die Mehrzahl der Enzyme in den Einzelmessungen eine Steigerung der spezifischen Aktivität in Transformanten des haploiden Rezipientenstammes beobachtet werden konnte, sollten im Folgenden die spezifischen Aktivitäten einiger ausgewählter Enzyme für die gesamte pMHE-Plasmidserie bestimmt werden. Diese Untersuchungen schlossen auch pMHE22 mit ein, das das *PFK1_{atp}*-Allel zur Produktion einer nicht-allosterischen Phosphofruktokinase trägt. Als Rezipient diente wiederum der haploide Hefestamm K39 (*ura3 leu2*), wobei mit Uracil- bzw. Leucin-Mangelmedium auf die Präsenz der Plasmide selektiert wurde. Als Indikatorenzyme wurden solche aus dem oberen (Hxk, Pfk) und unteren (Pyk, Pgk) Teil der Glykolyse gewählt, sowie die Pyruvatdecarboxylase (Pdc) als spezifischen Schritt der Ethanolproduktion. Die spezifischen Aktivitäten sind in Tab. 3.2.2 zusammengefaßt. Hieraus kann auf eine moderate Überproduktion dieser Enzyme in den entsprechenden Transformanten geschlossen werden, die sich um den Faktor 2-4 im Vergleich zur Kontrolle bewegt. Lediglich für die Pyruvatdecarboxylase (Pdc) ist nur eine Erhöhung um den Faktor 1,2 bis 1,5 festzustellen. Generell zeichnet sich allerdings eine Tendenz ab, nach der mit zunehmender Zahl der eingesetzten Gene die relative Überproduktion abnimmt. So ist etwa im Falle der

Tab. 3.2.2: Spezifische Enzymaktivitäten [mU/mg Protein] in Rohextrakten aus Transformanten des Hefestammes K39 mit den angegebenen Konstrukten

Plasmid	Hxk		Pfk		Pgk		Pyk		Pdc	
	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T
pMHE1	726	3550 (4,9)	469	1978 (4,2)	7000	7838 (1,1)	4921	4902 (1,0)	1188	1233 (1,0)
pMHE2	642	532 (0,8)	451	420 (0,9)	6510	5560 (0,8)	5055	14512 (2,9)	1030	1588 (1,5)
pMHE3	726	1916 (2,6)	469	1004 (2,1)	7000	6990 (1,0)	4921	5235 (1,1)	1188	971 (0,8)
pMHE4	642	556 (0,9)	451	435 (1,0)	6510	18940 (2,9)	5055	14034 (2,8)	1030	1534 (1,5)
pMHE5	726	1434 (2,0)	469	906 (1,9)	7000	7185 (1,0)	4921	5117 (1,0)	1188	905 (0,8)
pMHE6	642	430 (0,7)	451	351 (0,8)	6510	15960 (2,5)	5055	9608 (1,9)	1030	1242 (1,2)
pMHE7	726	1256 (1,7)	469	878 (1,9)	7000	6517 (0,9)	4921	4479 (0,9)	1188	861 (0,7)
pMHE8-3	642	425 (0,7)	451	331 (0,7)	6510	17467 (2,7)	5055	12290 (2,4)	1030	1503 (1,5)
pMHE22	726	1316 (1,8)	469	822 (1,8)	7000	6374 (0,9)	4921	4332 (0,9)	1188	851 (0,7)

Für die verwendeten Abkürzungen der Enzyme vgl. Tab. 3.2.1; K = Kontrolle (YEp351/YEp352); T = Transformante (pMHE#); grau hinterlegt: erwartete Überproduktion für dieses Enzym aufgrund der Anwesenheit des Gens auf dem angegebenen Plasmid

Die spezifischen Enzymaktivitäten in Doppelbestimmungen aus einem Rohextrakt wichen nicht mehr als 15% voneinander ab. Rohextrakte aus unterschiedlichen Versuchsansätzen zeigten dagegen erhebliche Abweichungen, sodass hier die Werte von parallel durchgeführten Experimenten angegeben sind. Alle Rohextrakte wurden aus Kulturen hergestellt, die im entsprechenden Selektivmedium angezogen wurden und in der exponentiellen Wachstumsphase (zw. $OD_{600} = 1,5$ und $4,0$) geerntet wurden.

Phosphofruktokinase mit pMHE1 (*HXK2, PFK1, PFK2*) noch eine 4-fach erhöhte spezifische Aktivität zu messen, die bei pMHE3 (*HXK2, PFK1, PFK2, ADH1*) bereits auf das 2-fache des Wildtyps absinkt und bei pMHE7 (*HXK2, PGII, PFK1, PFK2, ADH1*) den 1,8-fachen Wert erreicht. Ein ähnlicher Verlauf kann für die Hexokinase beobachtet werden. In den Werten weniger unterschiedlich, aber tendenziell ähnlich, verhalten sich die spezifischen Aktivitäten der Pyruvatkinase und der Pyruvatdecarboxylase.

Trotz der teilweise nur geringen Steigerung in der spezifischen Aktivität einzelner Enzyme kann aus diesen Daten aber geschlossen werden, dass eine gleichzeitige Überproduktion in dem haploiden Rezipienten K39 durchaus möglich ist.

3.2.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in Transformanten mit allen plasmidkodierten Genen

Die oben beschriebenen Vorversuche zeigten die prinzipielle Möglichkeit, an der Glucoseverwertung beteiligte Gene in einem haploiden Hefestamm unter Selektionsbedingungen zur Überexpression zu bringen. In der industriellen Anwendung hat sich allerdings gezeigt, dass solche haploiden Hefestämme mit verschiedenen Auxotrophien in natürlichen Substraten eine deutlich verringerte Wachstums- und Ethanolbildungsrate im Vergleich zu ihren diploiden, prototrophen Abkömmlingen aufweisen (Schehl *et al.*, 2004). Daher wurde die Kombination derjenigen pMHE-Konstrukte, die die gleichzeitige Überproduktion aller plasmidkodierten Proteine erlauben sollte, in einem diploiden Stammhintergrund getestet. Zu diesem Zweck wurden die Stämme K39 (*MAT α ura3 leu2 his3*) und K18 (*MAT α ura3 leu2*) eingesetzt. K39 diente als Rezipient für die Plasmide YEp352 (*URA3*), pMHE7 (*URA3 - HXK2, PGII, PFK1, PFK2, ADH1*) und pMHE22 (*URA3 - HXK2, PGII, PFK1_{ap}, PFK2, ADH1*), mit Selektion auf Uracil-freiem Medium. Die Plasmide YEp351 (*LEU2*) und pMHE6 (*LEU2 - HXT1, FBA1, PGK1, GPM1, ENO2, PYK1, PDC1*) wurden in den Stamm K18 unter Selektion auf Leucin-Prototrophie eingebracht. Da weder pMHE8-1 (*TDH1*), noch pMHE8-3 (*TDH2*) in den Vorversuchen eine Steigerung der spezifischen Triosephosphatdehydrogenase-Aktivität bewirkten, wurde auf den Einsatz dieser Plasmide in den folgenden Versuchen verzichtet und pMHE6 benutzt.

Diploide Stämme mit jeweils zwei der Plasmide wurden durch Kreuzung und Anzucht auf Glucosemedium ohne Zusatz von Basen und Aminosäuren erhalten. Dieses Medium ist gleichzeitig selektiv für den Erhalt beider Plasmide. Auf einem solchen Minimalmedium angezogene Stämme wurden zur Herstellung von Rohextrakten und zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten herangezogen (Tab. 3.2.3).

Tab. 3.2.3 Spezifische Enzymaktivitäten [mU/mg Protein] in Rohextrakten aus diploiden Transformanten mit den angegebenen Konstrukten

Enzym	YEp351/YEp352	pMHE6/pMHE7		pMHE6/pMHE22	
	spez. Akt.	spez. Akt.	Faktor	spez. Akt.	Faktor
Hxk	932	1206	1,3	1005	1,1
Pgi	2973	4363	1,5	3440	1,2
Pfk	535	549	1,0	504	0,9
Fba	931	1259	1,4	1778	1,9
Tpi	38367	62449	1,6	47471	1,2
Tdh	2611	1350	0,5	1914	0,7
Pgk	8616	14553	1,7	18836	2,2
Gpm	437	621	1,4	962	2,2
Eno	5423	10241	1,9	16192	3,0
Pyk	5037	6805	1,4	11314	2,2
Pdc	1258	891	0,7	1489	1,2
Adh	3109	5277	1,7	4759	1,5

Für die verwendeten Abkürzungen der Enzyme vgl. Tab. 3.2.1.

Die Rohextrakte wurden von Kulturen erhalten, die sich in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,7$ für pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22, $OD_{600} = 4,2$ für YEp351/YEp352) befanden. Es wurden in verschiedenen Experimenten insgesamt drei unabhängige Kulturen getestet, wobei hier die Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten angegeben sind. Hierbei traten in den Messungen Standardabweichungen von bis zu 50% auf. Allerdings wich das Verhältnis zur Wildtyp-Kontrolle (= Faktor als Quotient aus den spezifischen Aktivitäten der "Überproduzenten" zu denen von YEp351/YEp352) in den einzelnen Experimenten nicht um mehr als 25% voneinander ab.

Legt man eine zweifache Steigerung der spezifischen Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle als Grenze für eine moderate Überproduktion zugrunde, so zeigen die Messungen, dass in der Kombination pMHE6/pMHE7 keiner der Werte dieses Kriterium erfüllt. Vielmehr zeigt sich im Falle der Triosephosphatdehydrogenase, von der keines der drei für die Isoenzyme kodierenden Gene plasmidkodiert war, sogar eine Halbierung der spezifischen Enzymaktivität. Für die Kombination pMHE6/pMHE22, die sich nur durch das modifizierte *PFK1_{atp}*-Allel und die damit eingebrachte Kanamycin-Resistenzkassette von der ersten Kombination unterscheidet, kann dagegen im unteren Teil der Glykolyse (Pgc bis Pyk) noch von einer Überproduktion gesprochen werden, die aber weder im oberen Teil (Hxk bis Tpi) noch in den Folgereaktionen (Pdc und Adh) zu verzeichnen ist.

Diese und die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Daten legen nahe, dass bei einer Überexpression verschiedener am Glucosestoffwechsel beteiligten Enzyme Regulationsmechanismen greifen, die letztlich eine verringerte Expression zur Folge haben.

3.2.4 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in Transformanten des diploiden Laborstammes und von Industriestämmen

In der Praxis werden verschiedene Trockenhefe-Präparate z.B. für die Vergärung von Obstmaischen angeboten, die laut Herstellerangaben für diese Zwecke optimiert wurden. Über die genetische Ausstattung solcher Stämme (d.h. ob sie haploid, diploid oder aneuploid sind) sind allerdings keine Informationen erhältlich. Aufgrund der hervorragenden Gäreigenschaften solcher Stämme könnte man allerdings vermuten, dass sich die spezifischen Aktivitäten von Glykolyseenzymen deutlich von denen herkömmlicher Laborstämme unterscheiden. Daher wurden hier die Stämme SIHA Aktiv-Hefe 6 und Uvaferm GCG62 mit den oben beschriebenen Transformanten von diploiden Laborstämmen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2.4 zusammengefasst. Legt man wiederum einen Faktor von zwei als signifikante Abweichung der spezifischen Enzymaktivitäten in den untersuchten Stämmen im Vergleich zur Kontrolle zugrunde, so sind weder in den Industriestämmen, noch in dem diploiden Laborstamm, der die beiden Plasmide pMHE6 und pMHE7 trägt, deutliche Abweichungen zu erkennen. Einzige Ausnahme bildet die Alkoholdehydrogenase im Laborstamm, die hier eine 2,7-fache Erhöhung zeigt. Dies wird allerdings durch die Messungen in Abschnitt 3.2.3 relativiert, wo nur eine Steigerung der spezifischen Aktivität um den Faktor 1,7 gegenüber der Kontrolle beobachtet wurde.

Tab. 3.2.4 Spezifische Enzymaktivitäten [mU/mg Protein] in Rohextrakten aus diploiden Transformanten mit den angegebenen Konstrukten und Industriestämmen

Enzym	YEp351/YEp352	pMHE6/pMHE7		SIHA Aktiv-Hefe 6		Uvaferm CGC62	
	spez. Akt.	spez. Akt.	Faktor	spez. Akt.	Faktor	spez. Akt.	Faktor
Hxk	974	1082	1,1	1495	1,5	838	0,9
Pgi	2049	3104	1,5	1657	0,8	1860	0,9
Pfk	841	998	1,2	717	0,9	749	0,9
Fba	903	787	0,9	1038	1,1	858	1,0
Tpi	43556	24490	0,6	34105	0,8	25195	0,6
Tdh	2519	1576	0,6	3113	1,2	3009	1,2
Pgk	7541	8266	1,1	4394	0,6	5306	0,7
Gpm	802	1151	1,4	784	1,0	663	0,8
Eno	3404	3704	1,1	2426	0,7	2364	0,7
Pyk	5545	9774	1,8	5858	1,1	4639	0,8
Pdc	1198	1564	1,3	1250	1,0	1442	1,2
Adh	2365	6289	2,7	1856	0,8	2315	1,0

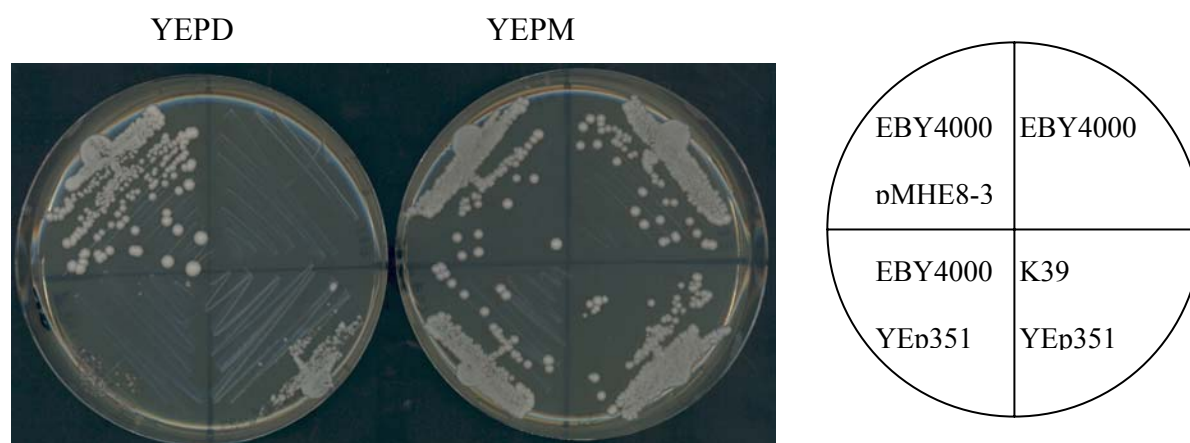
Für die verwendeten Abkürzungen der Enzyme vgl. Tab. 3.2.1.

Die Rohextrakte wurden von Kulturen erhalten, die auf SCura/leu angezogen wurden und sich bei der Ernte etwa in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 3,5$ für SIHA, 4,6 für Uvaferm, 4,5 für YEp351/YEp352 und 1,8 für pMHE6/pMHE7) befanden. Die angegebenen Daten sind Durchschnittswerte einer Doppelbestimmung.

3.2.5 Komplementation von Mutanten mit defektem Glucosetransport durch pMHE8-3

Die Sequenzierung des *HXT1*-Gens aus pJJH543 hatte einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch in einer der transmembranen Domänen ergeben (Tyrosin 379 → Histidin; vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Um zu beweisen, dass hierdurch die Transportfunktion nicht irreparabel geschädigt ist, wurde ein Komplementationsversuch mit dem pJJH543-Derivat pMHE8-3 durchgeführt, das das gleiche Gen trägt. Dazu wurde der Stamm EBY4000 (Wieczorke *et al.*, 1999) als Rezipient gewählt, der in allen Genen, die für mögliche Glucosetransporter kodieren, Deletionen trägt. Dieser Stamm ist noch in der Lage, Maltose als Kohlenstoffquelle zu verwerten, nicht aber Glucose. Wie aus Abb. 3.2.5 ersichtlich wird, kann der Rezipientenstamm ebenso wie die Wildtyp-Kontrolle (Stamm K39) auf Vollmedium mit 2% Maltose wachsen, unabhängig davon, ob und welches Plasmid er trägt. Auf Vollmedium mit 2% Glucose wachsen dagegen nur die Wildtyp-Kontrolle und der EBY4000-Rezipient, der das Plasmid pMHE8-3 trägt. Eine Transformante mit einem Leervektor, sowie der Rezipient ohne Plasmid zeigen erwartungsgemäß kein Wachstum. Daraus wurde geschlossen, dass das in pMHE8-3 (und damit auch in pJJH543) enthaltene *HXT1*-Gen für einen funktionellen Hexosetransporter kodiert.

Abb. 3.2.5 Komplementation des Hexosetransports in EBY4000



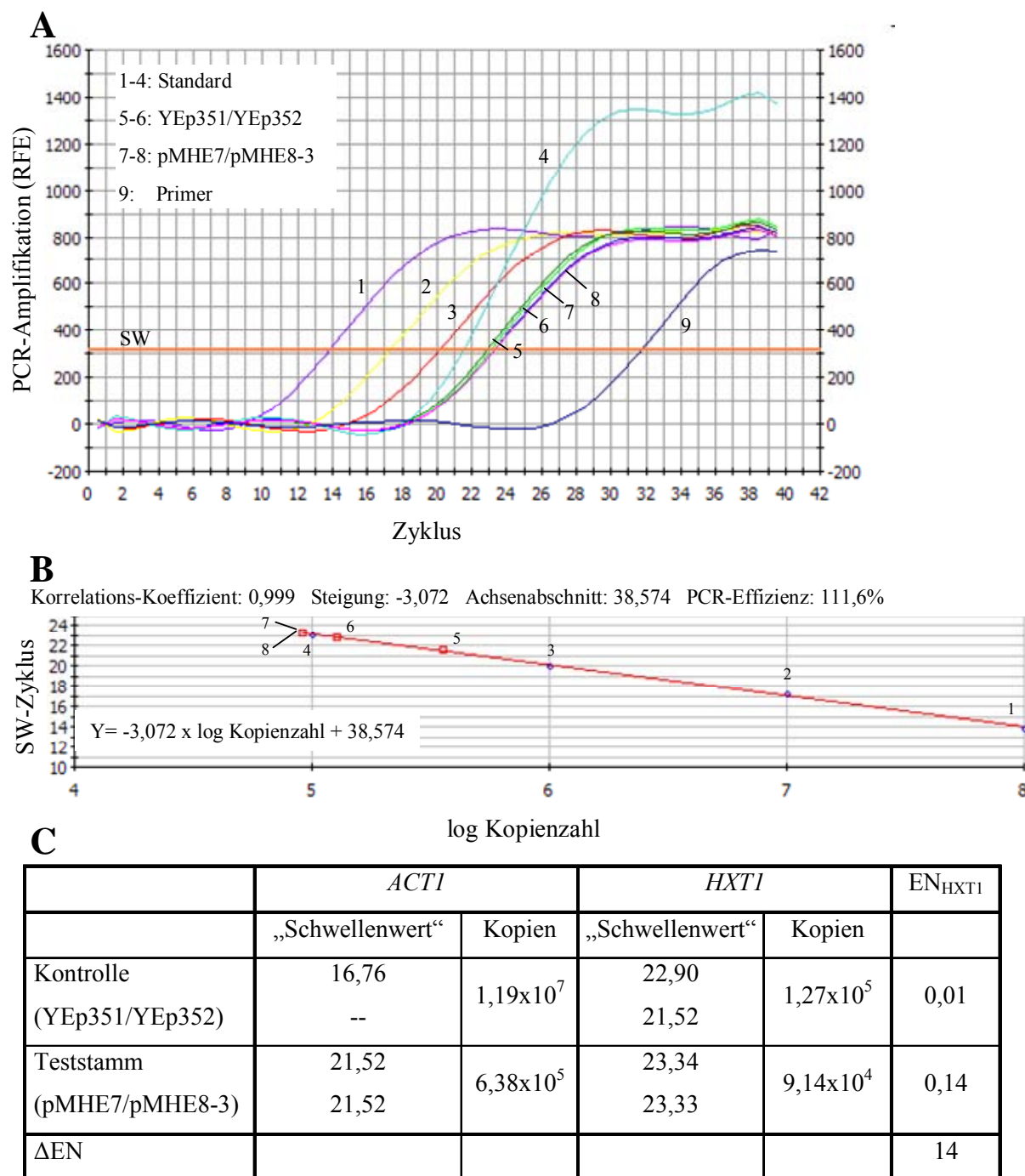
Verdünnungsausstrich des Stammes EBY4000 ohne Plasmid (EBY4000), mit plasmidkodiertem *ADH1p-HXT1* (EBY4000 pMHE8-3) und mit "Leervektor" YEp351 (EBY4000 YEp351) im Vergleich zur Kontrolle K39 mit "Leervektor" (K39 YEp351) auf Vollmedium mit Glucose (YEPD) und Maltose (YEPM).

3.2.6 Transkriptionsmessungen

Als weiterer Anhaltspunkt für die Überexpression von Genen, die sich anhand der spezifischen Enzymaktivitäten nicht bestimmen ließen, ist die Quantifizierung der in entsprechenden Transformanten gebildeten mRNA. Dazu wurde die Methode der "real-time"-RT-PCR (im Folgenden immer als RT-PCR abgekürzt) verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.16).

3.2.6.1 Expression von *HXT1*

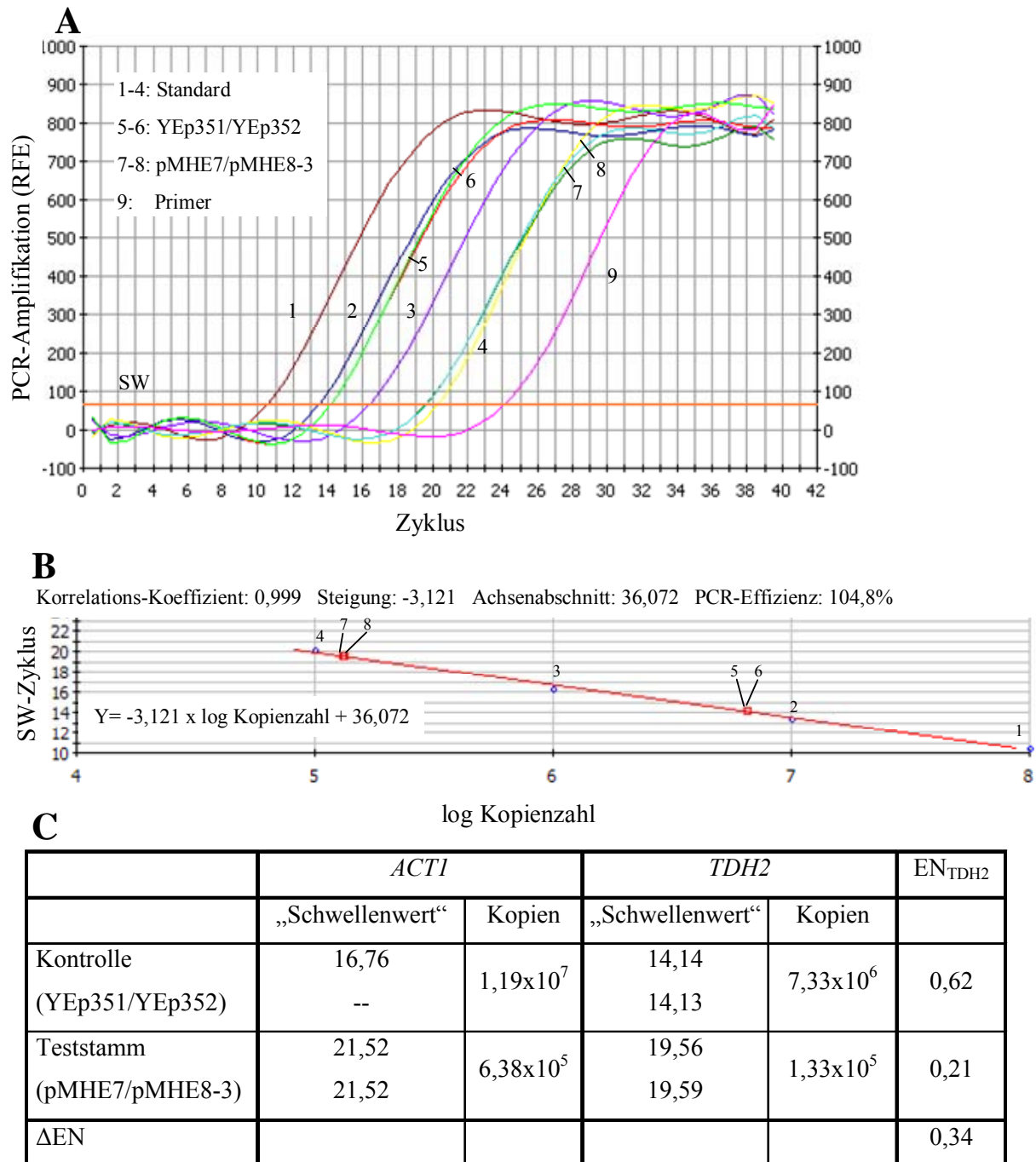
Wie oben angemerkt war eine Bestimmung der Aktivität des Glucosetransporters *in vivo* im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Um trotzdem einen ersten Anhaltspunkt für die tatsächliche Überexpression des plasmidkodierte *HXT1*-Gens zu erhalten, wurde daher die Konzentration der gebildeten mRNA in Transformanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Als interner Standard diente dabei das Gen *ACT1*, das konstitutiv exprimiert wird. Die Konzentration der RNA wurde sowohl für *HXT1* (Abb. 3.2.6.1), als auch für *ACT1* (Abb. 3.2.6.3) bestimmt und in Abb. 3.2.6.1C ausgewertet. Wie sich aus diesen Werten ableiten läßt, kommt es zu einer 14-fachen Überexpression des plasmidkodierte *HXT1*-Gens. Daraus kann in erster Näherung geschlossen werden, dass sich auch die Konzentration des kodierten Hexosetransporters gegenüber Wildtyp-Zellen stark erhöhen sollte.

Abb. 3.2.6.1 Ermittlung der Kopienzahlen für *HXT1* -mRNA mit RT-PCR

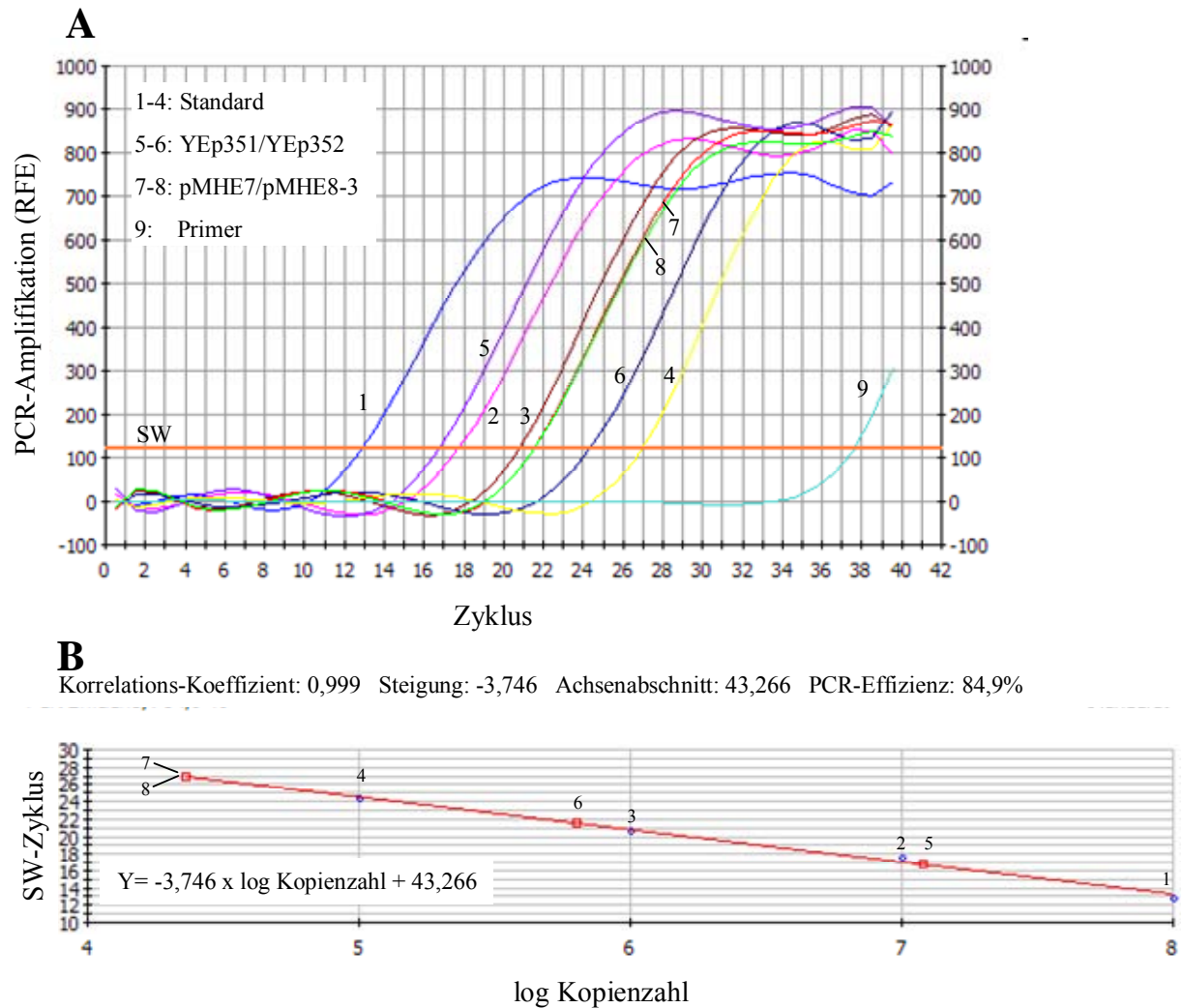
Transformanten des Stammes K18xK39 mit YEp351/YEp352 (Kontrolle) und pMHE7/pMHE8-3 wurden in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glucose bis zu einer OD₆₀₀ von 4,5 resp 2,0 herangezogen. mRNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit den Oligonukleotiden HXTTrt1 und HXTTrt2 für die RT-PCR verwendet, wie in 2.2.16.2 beschrieben. Als Mengenstandard wurden Verdünnungen von Plasmid-DNA von pJH543 (*HXT1*) verwendet. A: Überschreitung des Schwellenwerts (SW) der Proben pMHE7/pMHE8-3 (7-8) und YEp351/YEp352 (5-6), der Standards (1-4) mit 10⁵-10⁸ Kopien/μl sowie der "Primer" HXTTrt1/HXTTrt2 (9). Angabe der PCR-Amplifikation in Relativen Fluoreszenz Einheiten (RFE) B: Ermittlung der Kopienzahl von YEp351/YEp352 (5-6) und pMHE7/pMHE8-3 (7-8) durch Erstellung einer Kalibriergerade mit den Standards (1-4). SW-Zyklus= Schwellenwert-Zyklus C: Tabelle mit je 2 Messwerten für die Ermittlung des Schwellenwertes, der daraus errechneten Anzahl von Kopien als Mittelwert (vgl. 2.2.16.5), EN_{HXT1} (Verhältnis der RNA-Menge aus *HXT1* zu *ACT1*) und ΔEN (EN_{HXT1} des Teststamms pMHE7/pMHE8-3 im Verhältnis zu EN_{HXT1} des Kontrollstamms YEp351/YEp352). Zur Ermittlung der Kopienzahlen von *ACT1* siehe Abb. 3.2.6.3.

3.2.6.2 Expression von *TDH2*

In Hefestämmen, die Plasmide mit dem *TDH2*-Gen tragen, konnte keine Erhöhung der spezifischen Triosephosphatdehydrogenase-Aktivitäten beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Daraus kann auf einen Regulationsmechanismus geschlossen werden, der die Überproduktion dieses Enzyms verhindert. Um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, auf welcher Ebene diese Regulation ausgeübt wird (d.h. transkriptionell oder posttranskriptionell), sollte auch hier die relative *in vivo*-Konzentration der zugehörigen mRNA bestimmt werden. Hierzu wurden für die RT-PCR die gleichen cDNA-Präparationen eingesetzt, die bereits für die Bestimmung der *HXT1*-Genexpression (vgl. Abschnitt 3.2.6.1) Verwendung fanden. Als interner Standard diente dabei das Gen *ACT1*, das konstitutiv exprimiert wird. Die Konzentration der RNA wurde sowohl für *TDH2* (Abb. 3.2.6.2), als auch für *ACT1* (Abb. 3.2.6.3) bestimmt und in Abb. 3.2.6.2 C ausgewertet. Wie aus den Werten ersichtlich wird, kommt es bei der Transformanten zu einer auf 1/3 verringerten Expressionsrate des *TDH2*-Genes, obwohl sowohl eine genomische, als auch mehrere plasmidkodierte Kopien in dem Stamm vorliegen. Daraus kann in erster Näherung geschlossen werden, dass hier eine Rückkopplung auf Transkriptionsebene stattfindet.

Abb. 3.2.6.2 Ermittlung der Kopienzahlen für *TDH2* –mRNA mit RT-PCR

Transformanten des Stammes K18xK39 mit YEp351/YEp352 (Kontrolle) und pMHE7/pMHE8-3 wurden in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glucose bis zu einer OD₆₀₀ von 4,5 resp 2,0 herangezogen. mRNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit den Oligonukleotiden TDH2RT1 und TDH2RT2 für die RT-PCR verwendet, wie in 2.2.16.2 beschrieben. Als Mengenstandard wurden Verdünnungen von Plasmid-DNA von pMHE11 (*TDH2*) verwendet. A: Überschreitung des Schwellenwerts (SW) der Proben pMHE7/pMHE8-3 (7-8) und YEp351/YEp352 (5-6), der Standards (1-4) mit 10⁵-10⁸ Kopien/μl sowie der "Primer" TDH2RT1/TDH2RT2 (9). Angabe der PCR-Amplifikation in Relativen Fluoreszenz Einheiten (RFE) B: Ermittlung der Kopienzahl von YEp351/YEp352 (5-6) und pMHE7/pMHE8-3 (7-8) durch Erstellung einer Kalibriergerade mit den Standards (1-4). SW-Zyklus= Schwellenwert-Zyklus C: Tabelle mit je 2 Messwerten für die Ermittlung des Schwellenwertes, der daraus errechneten Anzahl der Kopien als Mittelwert (vgl. 2.2.16.5), EN_{TDH2} (Verhältnis der RNA-Menge von *TDH2* zu *ACT1*) und ΔEN_{TDH2} (EN_{TDH2} des Teststamms pMHE7/pMHE8-3 im Verhältnis zu EN_{TDH2} des Kontrollstamms YEp351/YEp352. Zur Ermittlung der Kopienzahl von *ACT1* siehe Abb. 3.2.6.3.

Abb. 3.2.6.3 Ermittlung der Kopienzahlen für *ACT1*-mRNA mit RT-PCR

Transformanten des Stammes K18xK39 mit YEp351/YEp352 (Kontrolle) und pMHE7/pMHE8-3 wurden in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glucose bis zu einer OD600 von 4,5 resp 2,0 herangezogen. mRNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit den Oligonukleotiden ActRT3 und ActRT4 für die RT-PCR verwendet, wie in 2.2.16.2 beschrieben. Als Mengenstandard wurden Verdünnungen von Plasmid-DNA von pJH13 (*ACT1*) verwendet. A: Überschreitung des Schwellenwerts (SW) der Proben pMHE7/pMHE8-3 (7-8) und YEp351/YEp352 (5-6), der Standards (1-4) mit 10^5 - 10^8 Kopien/ μ l sowie der "Primer" ActRT3/ActRT4 (9). Angabe der PCR-Amplifikation in Relativen Fluoreszenz Einheiten (RFE) B. Ermittlung der Kopienzahl von YEp351/YEp352 (5-6) und pMHE7/pMHE8-3 (7-8) durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit den Standards (1-4). SW-Zyklus= Schwellenwert-Zyklus. Die Ermittlung der Anzahl der Kopien ist in Abb. 3.2.6.1C und Abb. 3.2.6.2C abgebildet.

3.3 Konstruktion eines diploiden Rezipienten zur Plasmidselektion auf komplexen Medien

Die bisher beschriebenen Versuche zur Überproduktion der an der Glucoseverwertung beteiligten Enzyme setzten die Verwendung von definierten synthetischen Mangelmedien voraus, mit denen auf den Erhalt der entsprechenden Plasmide in den Transformanten selektiert werden kann. In der Praxis werden zur Ethanolproduktion allerdings komplexe Rohstoffe (z.B. Traubenmaische, Obstmaischen, Getreidemaischen) verwendet, die eine Selektion auf Ernährungsdefizite (z.B. Ura-, Leu- Marken) nicht erlauben, und auch die Anwendung des G418-Markers scheidet vor den dort hantierten Volumina aus Kostengründen aus. Aus diesem Grund sollte hier ein diploider Laborstamm konstruiert werden, für den bereits die zur Vergärung angebotenen Zucker einen Selektionsdruck darstellen würden. Hierzu wurde auf die Beobachtung zurückgegriffen, dass die Deletion vieler Glykolysegene zum Verlust des Wachstums auf Hexosen führt (Ciriacy und Breitenbach, 1979). Dies gilt auch in Gegenwart von nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Glycerin, da deren Verwertung der Katabolit-Repression durch Hexosen unterliegt (Schüller, 2003). Ein diploider Stamm mit homozygoten Deletionen sowohl für das *pgi1*- als auch für das *pyk1*-Gen sollte also nur dann auf glucosehaltigen Medien wachsen können, wenn er Plasmide trägt, die die Wildtypgene (*PGII* bzw. *PYK1*) enthalten.

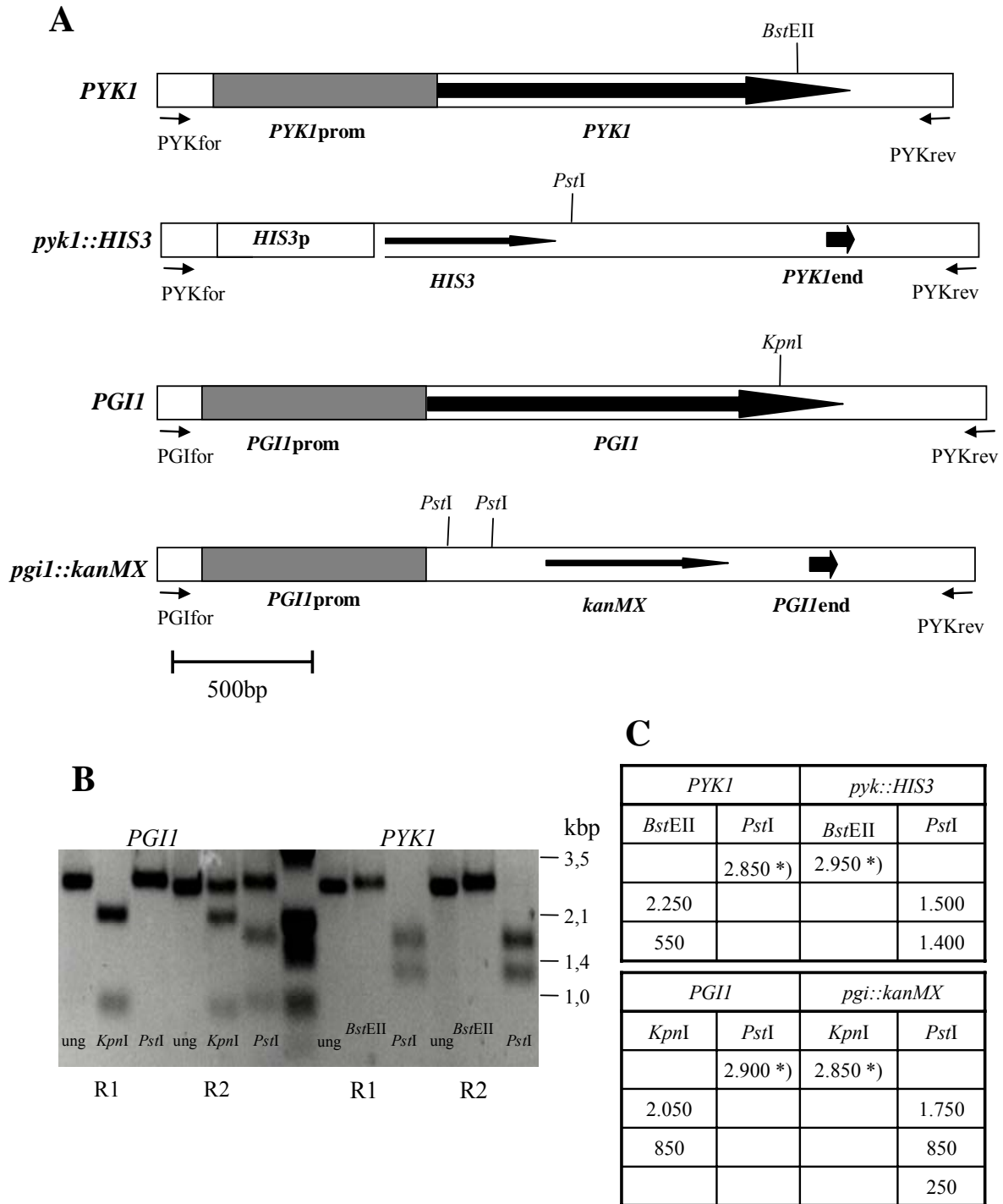
Zur Konstruktion sollten haploide Elternstämme mit den entsprechenden Deletionen verwendet werden. Dazu diente einerseits der Stamm VWH3A (615) mit einer *pyk1*-Deletion (*MATa ura3-52 his3 trp1 leu2-3,112 MAL2-8^c SUC2 GAL pyk1::HIS3*). Die *pgi1*-Deletion wurde aus dem diploiden Stamm Y23336 (*MATa/MAT α his3 Δ 1/ his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 MET15/met15 Δ 0 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 PGII/*pgi1::kanMX*) durch Sporulation und Tetradenanalyse erhalten. Segreganten mit dem deletierten Allel wurden auf Medium mit Glycerin und Ethanol als Kohlenstoffquellen erhalten, zeigten G418-Resistenz und wuchsen nicht auf Medien mit 2% Glucose. Allerdings muss bei solchen Stämmen dem Medium Glucose in geringen Mengen (0.01%) zugesetzt werden, um ein Wachstum zu erlauben (Aguilera, 1986). Segreganten mit komplementärem Paarungstyp wurden miteinander gekreuzt und einer Tetradenanalyse unterzogen. Hieraus konnten allerdings keine Segreganten gewonnen werden, die eine Doppeldeletion (*pgi1 pyk1*) trugen. Dies legte den Verdacht nahe, dass solche Defektmutanten im vorliegenden Stammhintergrund schlecht auskeimen bzw. nicht lebensfähig sind.*

Aus diesem Grund wurden zunächst die Plasmide pMHE6 (*LEU2 - HXT1, FBA1, PGK1, GPM1, ENO2, PYK1, PDC1*) und pMHE22 (*URA3 - HXK2, PGII, PFK1_{ap}, PFK2, ADHI*) in

einen der haploiden Stämme mit der *pgi1*-Deletion eingebracht. Aufgrund der Tatsache, dass *TDH2* nach den enzymatischen Bestimmungen (vgl. Abschnitt 3.2.2) und den Transkriptionsmessungen (vgl. Abschnitt 3.2.6.2) nicht zur Überexpression geeignet ist, wurde im Weiteren darauf verzichtet, das dieses Gen tragende Plasmid pMHE8-3 einzusetzen. Nach Kreuzung der Transformante mit VWH3A (615) (*MATa pyk1::HIS3*) wurden die Diploiden sporuliert und haploide Segreganten aus einer Tetradenanalyse mit genomischer Deletion der beiden Glykolysegene (*pgi1::kanMX pyk1::HIS3* pMHE6 pMHE22) erhalten. Da sowohl das *PGII*- als auch das *PYK1*-Wildtypgen plasmidkodiert vorliegen, waren diese Stämme in der Lage, auf glucosehaltigem Medium zu wachsen. Je zwei dieser Segreganten mit unterschiedlichem Paarungstyp wurden dann wieder zu diploiden Stämmen gekreuzt (*MATa/a his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 ura3/ura3 trp1-289/TRP1 MET15/met15Δ0 pyk1::HIS3/pyk1::HIS3 pgi1::kanMX/PGII* pMHE6 pMHE22). Diese wurden mehrfach in Vollmedium (YEED) angezogen und mit Hilfe von PCR in Kombination mit einer Restriktionsanalyse auf das Vorliegen der entsprechenden Deletionen überprüft. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass nur die genomischen Kopien, nicht aber die plasmidkodierten Gene ein Produkt ergeben. In Abb. 3.3.1A sind die PCR-Produkte dargestellt, die sowohl für die Wildtyp-Gene als auch für die entsprechenden Deletionen zu erwarten wären. Wie aus Abb. 3.3.1B und Abb. 3.3.1C hervorgeht, tragen die beiden untersuchten Stämme homozygot das *pyk1::HIS3*-Deletionsallel. Für den *PGII*-Locus zeigte sich allerdings, dass der mit "R1" bezeichnete Stamm homozygot für das Wildtyp-Allel ist, während der zweite Stamm heterozygot (*PGII/pgi1::kanMX*) vorliegt. Dieser wurde mit MDH2 bezeichnet und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Ein auch für das *pgi1::kanMX*-Deletionsallel homozygoter Stamm wurde zwar nach erneuter Sporulation und Rückkreuzung erhalten, konnte aber im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr näher charakterisiert werden.

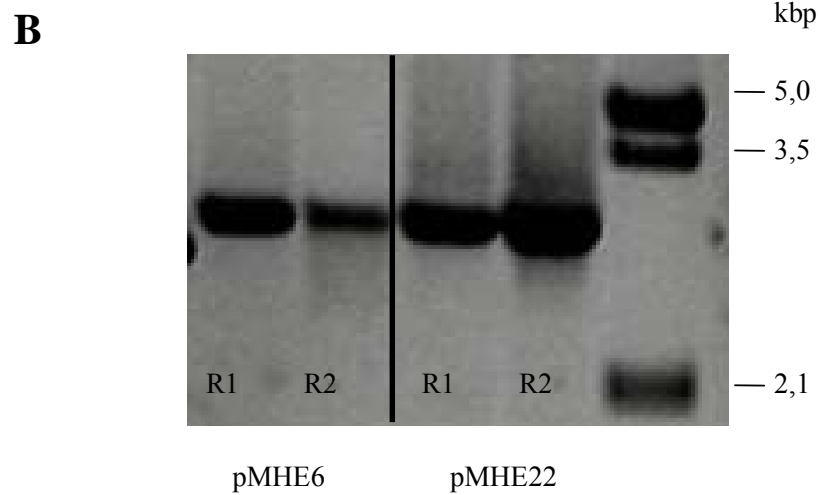
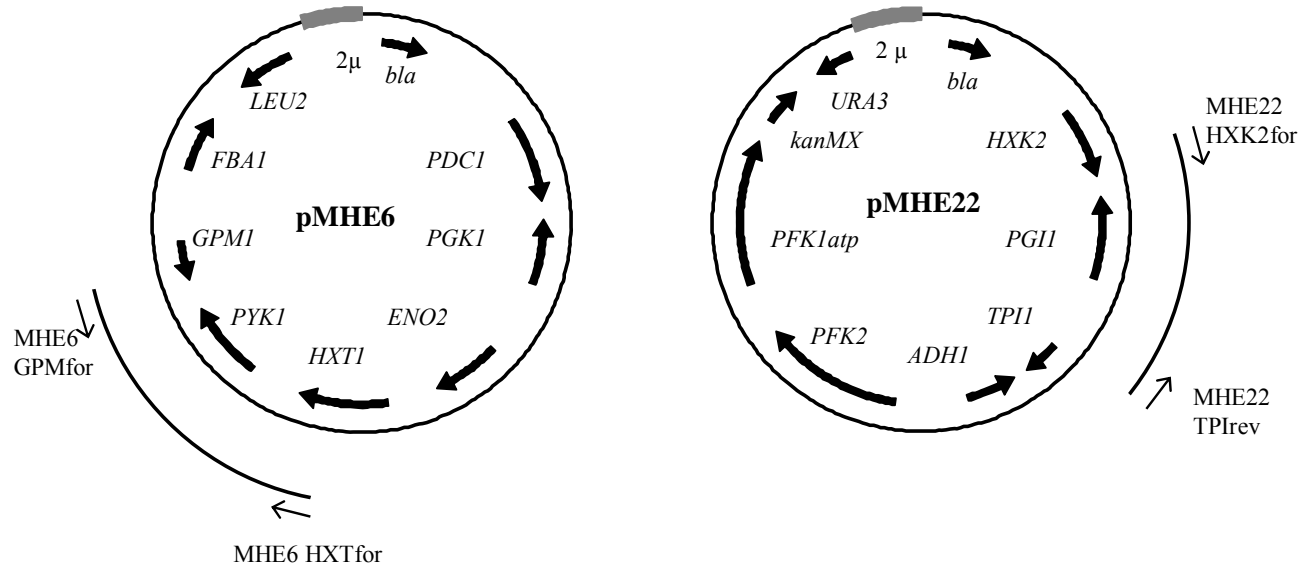
Auch der Nachweis für das Vorhandensein der Plasmide pMHE6 und pMHE22 wurde, neben dem Wachstum auf Leucin- bzw. Uracil-freien Medien, mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide und PCR geführt (Abb. 3.3.2). Damit konnte für beide Stämme gezeigt werden, dass zumindest die drei untersuchten Gene in der für das jeweilige Plasmid erwarteten Anordnung vorliegen. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Plasmide in der Zelle unverändert vorliegen.

Abb. 3.3.1 Nachweis der Deletionen in den Rezipientenstämmen R1 und R2 (MDH2)



Die Rezipientenstämmen R1 und R2 wurden mittels PCR und Restriktionsanalyse auf die Deletionen *pyk1::HIS3* und *pgi1::kanMX* untersucht. A: Restriktionskarte für *PGI1* und *pgi1::kanMX* sowie *PYK1* und *pyk1::HIS3* mit den Restriktionserkennungsstellen *BstEII*, *KpnI* und *PstI*. Die Bindestellen der "Primerpaare" *PYKfor*/*PYKrev* und *PGIfor*/*PGIrev* für die PCR sind ebenfalls angegeben. B: Restriktionsanalyse der PCR-Fragmente aus genomischer DNA von R1, R2 und VWH1A als ungeschnittene Kontrolle (ung). C: Erwartete Fragmentlängen zu B, wobei mit *) gekennzeichnete Fragmente den ungeschnittenen PCR-Produkten entsprechen. R2 wurde im weiteren verwendet und als MDH2 bezeichnet.

Abb. 3.3.2 Nachweis der Plasmide pMHE6 und pMHE22 in den Rezipientenstämmen R1 und R2 (MDH2)



A: Bindestellen der Oligonukleotide MHE6HXTfor und MHEGPMfor und das erwartete PCR-Fragment für pMHE6 sowie Bindestellen der Oligonukleotide MHE22HXT2for und das erwartete PCR-Fragment für pMHE22. B: Die erhaltenen PCR-Fragmente mit den Oligonukleotidpaaren MHE6HXTfor/ MHEGPMfor und MHE22HXT2for/ MHE22TPIrev bestätigen in der Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Fragmentlängen für pMHE6 (3.290 bp) und für pMHE22 (3.100 bp) für die zwei Rezipientenstämmen R1 und R2 (MDH2).

3.4 Untersuchungen zu Wachstum und Glykolysefluss

Ziel dieser Arbeit war letztlich die Auswirkungen der Überproduktion von an der Glucoseverwertung beteiligten Proteinen auf die Physiologie der Hefe *in vivo* zu untersuchen. Dazu sollte sowohl das Wachstumsverhalten, als auch die Glucoseverbrauchs- und Ethanolbildungsraten der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Hefetransformanten bestimmt werden.

3.4.1 Einfluß der Überexpression verschiedener Gene auf das Wachstum

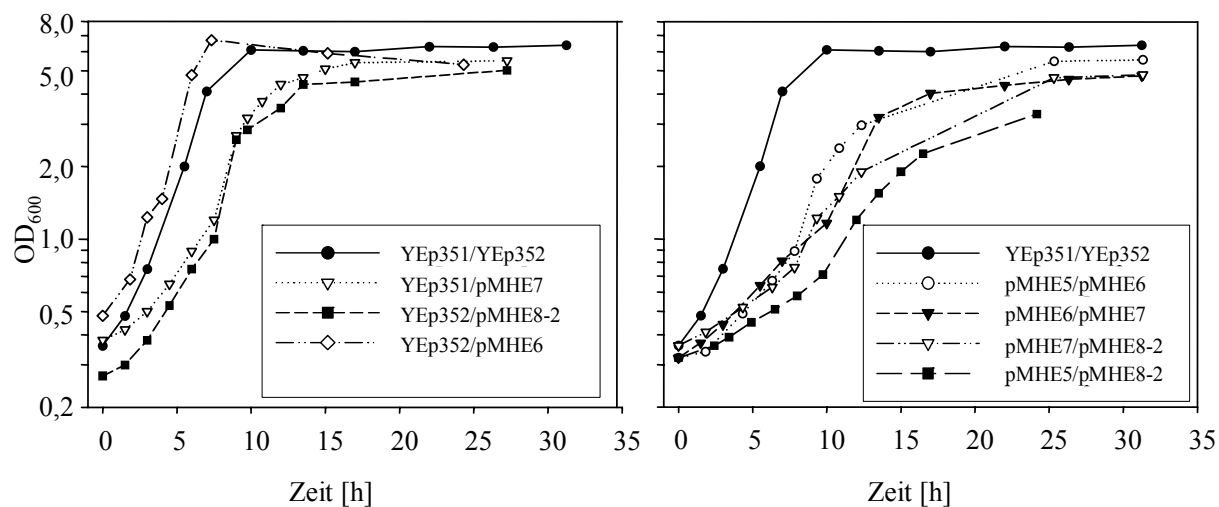
Im Laufe der oben beschriebenen Arbeiten wurde beobachtet, dass einige der Hefestämme, die Plasmide mit zahlreichen Glykolysegenen trugen, deutlich schlechter wuchsen als die entsprechenden Kontrollen mit den "Leervektoren". Dieser Eindruck sollte im Folgenden anhand von Wachstumskurven verifiziert werden.

In einem ersten Ansatz wurden daher verschiedene Zwischenkonstrukte und Plasmidkombinationen in den haploiden Stamm K39 (*ura3 leu2*) eingebracht und auf einem entsprechenden Mangelmedium mit 2% Glucose als einziger Kohlenstoffquelle angezogen. Die so erhaltenen Wachstumskurven sind in Abb. 3.4.1.1 dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass die Transformanten mit den "Leervektoren" (YEp351/YEp352), in die keine zusätzlichen Glykolysegene eingebracht wurden, mit Abstand am schnellsten wachsen. Darüber hinaus ist eine Tendenz zu erkennen, nach der mit zunehmender Zahl von plasmidkodierten Genen die Wachstumsrate abnimmt. Allerdings ist dabei nach einer Inkubationszeit von etwa 8h in vielen Fällen nochmals eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate zu beobachten, die auf eine Anpassung der Stämme hindeutet. Die in der stationären Phase erreichten Zelldichten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander.

Wie sich aus der Auswertung dieser Kurven ergibt (Abb. 3.4.1.1), ist eine Verlängerung in der Generationszeit von etwa 1,8 h in der Kontrolle (YEp351/YEp352) bis zu 5,2 h in den Transformanten mit allen hier untersuchten Genen (pMHE7/pMHE8-2) zu verzeichnen. Die extremen Schwankungen bei einigen Doppelbestimmungen (pMHE5/pMHE6 und pMHE7/pMHE8-2) deuten auch hier darauf hin, dass bei längerer Anzucht durch Anpassungsmechanismen wieder höhere Wachstumsraten erreicht werden können.

In einem weiteren Versuch wurde auch das Wachstumsverhalten diploider Transformanten untersucht, die durch Kreuzungen aus haploiden Stämmen (Rezipienten K18 bzw. K39), wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, erhalten wurden. Hiermit konnte das für die haploiden Transformanten beobachtete Wachstumsverhalten generell bestätigt werden. Auch die

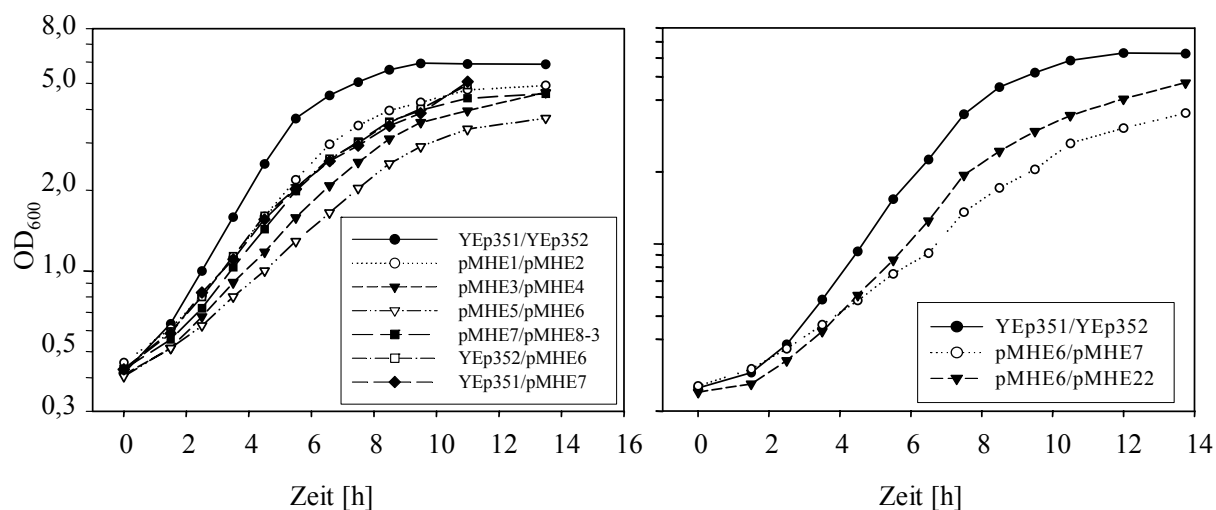
diploiden Stämme zeigten mit den "Leervektoren" (YEp351/YEp352) noch ein deutlich schnelleres Wachstum als diejenigen, die Plasmide mit Glykolysegenen enthielten (Abb. 3.4.1.2). Die für die haploiden Stämme beobachtete Anpassung mit einer Steigerung der Wachstumsrate nach längerer Inkubation ist allerdings hier nicht zu verzeichnen. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Transformanten mit pMHE6/pMHE7 mit denjenigen mit pMHE6/pMHE22. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Art des plasmidkodierten *PFK1*-Allels, wobei es sich im ersten Fall um das Wildtyp-Allel, im zweiten Fall um das *PFK1_{atp}*-Allel handelt, das eine allosterisch veränderte Phosphofruktokinase bildet. Für letztere konnte ein reproduzierbar besseres Wachstumsverhalten gezeigt werden (Abb. 3.4.1.2). Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der Wachstumskontrolle über die allosterische Regulation der Phosphofruktokinase ausgeübt wird.

Abb. 3.4.1.1 Wachstum verschiedener Transformanten von K39

Plasmide	μ [h ⁻¹]	g [h]	n
YEp351/YEp352	0,39 ± 0,02	1,77 ± 0,07	5
YEp352/pMHE6	0,37	1,87	1
YEp352/pMHE8-2	0,28	2,48	1
YEp351/pMHE7	0,27	2,57	1
pMHE5/pMHE6	0,17 ± 0,08	4,66 ± 2,32	2
pMHE5/pMHE8-2	0,1 ± 0,03	7,22 ± 2,04	2
pMHE6/pMHE7	0,15 ± 0,05	5,56 ± 2,92	4
pMHE7/pMHE8-2	0,17 ± 0,08	4,62 ± 1,82	6

Wachstum von Transformanten von K39 mit verschiedenen Kombinationen von Glykolyseplasmiden und "Leervektoren" YEp351 bzw. YEp352. Die oben abgebildeten Wachstumskurven wurden in SCura/leu aufgenommen und sind repräsentativ für n Bestimmungen. Die Wachstumsraten (μ) und Generationszeiten (g) sind in der Tabelle angegeben und wurden jeweils als Durchschnitt aus n Bestimmungen ermittelt.

Abb. 3.4.1.2 Wachstum diploider Doppeltransformanten



Plasmide	μ [h ⁻¹]			g [h]			n
	K	T	T/K	K	T	T/K	
YEp352/pMHE6	0,34	0,30	0,87	2,02	2,34	1,15	1
YEp351/pMHE7	0,34	0,30	0,86	2,02	2,34	1,15	1
pMHE1/pMHE2	0,45±0,01	0,32 ±0,01	0,72	1,55±0,03	2,16±0,09	1,39	2
pMHE3/pMHE4	0,44	0,28	0,63	1,58	2,53	1,59	1
pMHE5/pMHE6	0,45±0,01	0,23 ±0,02	0,51	1,55±0,03	3,08±0,22	1,98	2
pMHE7/pMHE8-3	0,37±0,09	0,28 ±0,08	0,77	2,0±0,6	2,61±0,78	1,31	5
pMHE6/pMHE7	0,42±0,08	0,27 ±0,02	0,63	1,68±0,23	2,58±0,2	1,55	4
pMHE6/pMHE22	0,42±0,05	0,37 ±0,07	0,89	1,68±0,23	1,93±0,3	1,15	4

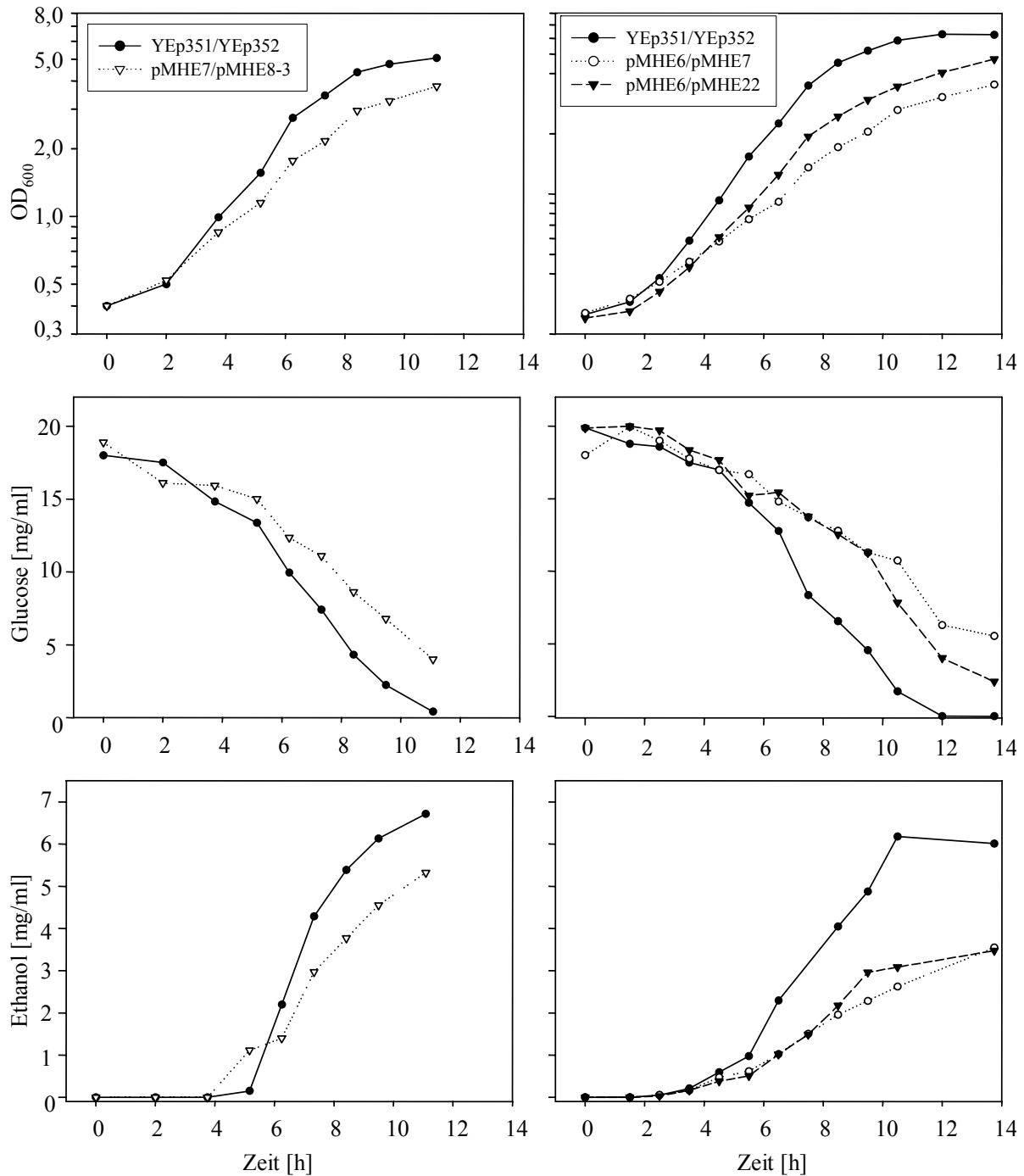
Wachstum von diploiden Transformanten (K18xK39) mit verschiedenen Kombinationen von Plasmiden in SCura/leu (oben). Die Wachstumsraten (μ) und Generationszeiten (g) wurden aus n Bestimmungen mit Standardabweichungen für die Transformanten (T) mit der angegebenen Plasmidkombination ermittelt. Der Kontrollstamm (K) wurde mit YEp351/YEp352 transformiert. T/K ist der Quotient aus der jeweiligen Transformante zur Kontrolle.

3.4.2 Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf den Glykolysefluss

Im Weiteren sollten die Glucoseverbauchs- und die Ethanolbildungsraten in den verschiedenen Transformanten bestimmt werden, um eine Aussage über die Veränderungen im Glykolysefluss zu ermöglichen. Dazu wurden zunächst wiederum diploide Transformanten herangezogen, die aus Kreuzungen von haploiden Transformanten der Rezipienten K18 und K39 erhalten wurden. Zur Anzucht wurde SCura/leu mit 2% Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. In Abb. 3.4.2.1 wurden die verschiedenen Parameter im Zusammenhang mit einer Wachstumskurve ermittelt. Auch hier zeigte sich das bereits oben beschriebene langsamere Wachstum der Transformanten mit verschiedenen plasmidkodierten Genen im Vergleich zur Kontrolle mit den "Leervektoren" (YEp351/YEp352). Wie erwartet, resultiert dies in einem ebenso verlangsamten Verbrauch der im Medium angebotenen Glucose und einer langsameren Bildung von Ethanol in den entsprechenden Stämmen. Um einen Eindruck von dem tatsächlichen Glykolysefluss zu erhalten, wurden daher Glucoseverbrauch und Ethanolbildung auf die Zellmasse bezogen (Tab. 3.4.2.1). Aufgrund der statistischen Schwankungen läßt sich aus diesen Daten keine wesentliche Veränderung der Glucoseverwertung und des Ethanolverbrauchs in den verschiedenen Transformanten im Vergleich zum Kontrollstamm (YEp351/YEp352) ableiten. Tendenziell zeigt sich eine leicht verringerte Ethanolausbeute in den Transformanten mit pMHE7/pMHE8-3 und pMHE6/pMHE7, mit 83% bzw. 88% der Kontrolle. Umgekehrt scheint die Ethanolausbeute in Stämmen mit pMHE6/pMHE22, die eine nicht-allosterische Phosphofruktokinase exprimieren, um etwa 10% erhöht zu sein.

Die zum großen Teil nur mäßig erhöhten spezifischen Aktivitäten der Enzyme, die in Rohextrakten aus diesen Transformanten bestimmt wurden (vgl. Abschnitt 3.2.3), sowie die in den Wachstumskurven mit dem haploiden Rezipienten beobachteten Anpassungsmechanismen, legten den Verdacht nahe, dass die in den Stämmen enthaltenen Plasmide rekombiniert haben könnten. Um dies zu untersuchen, wurde nach Abschluss der hier beschriebenen Experimente eine Plasmidisolierung mit anschließender Restriktionsanalyse durchgeführt. Wie aus Abb. 3.4.2.2 hervorgeht, konnten alle ursprünglich eingebrachten Plasmide wieder isoliert und in *E. coli* amplifiziert werden. Es wurden auch nur die für die ursprünglich eingebrachten Plasmide erwarteten Restriktionsfragmente beobachtet. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die eingebrachten Plasmide keinen größeren Veränderungen durch *in vivo*-Rekombinationsvorgänge unterworfen sind.

Abb. 3.4.2.1 Wachstum, Glucoseverbrauch und Ethanolbildung in verschiedenen diploiden Doppeltransformaten

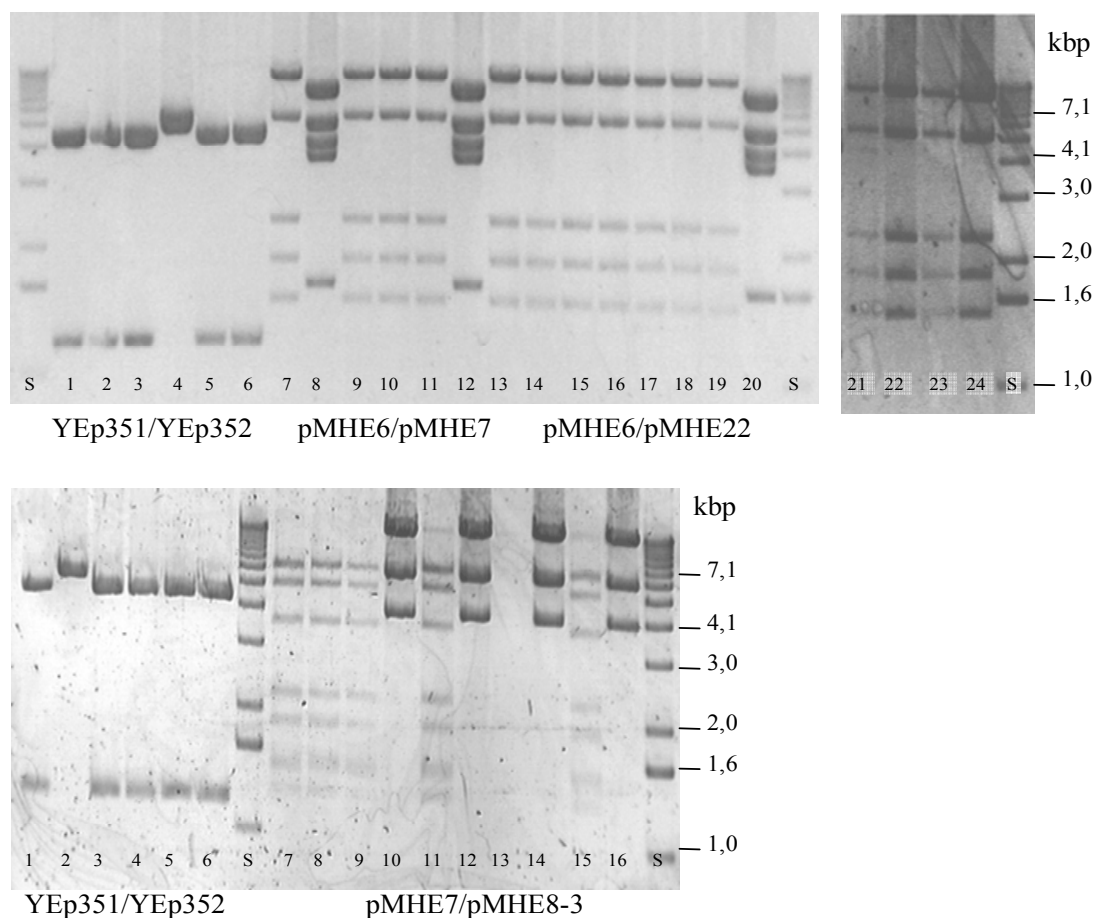


Diploide (K18xK39) Doppeltransformaten mit pMHE7/pMHE8-3 (links), pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 (rechts) wurden in SCura/leu angezogen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die OD₆₀₀ bestimmt (oben). Sterilfiltrierte Proben wurden tiefgefroren bis zur Analyse mit HPLC, wobei Glucose (Mitte) und Ethanol (unten) detektiert wurden. Als Kontrolle wurde in allen Fällen die diploide Doppeltransformante mit YEp351/YEp352 verwendet. Die angeführten Wachstumskurven für pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 entsprechen denen aus Abb. 3.4.1.2.

Tab.3.4.2.1 Ethanolbildungsrate, Glucoseverbrauchsrate und Ausbeute in diploiden Doppeltransformanten mit pMHE7/pMHE8-3, pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22

Stamm	μ_{\max}	$Y_{(S/X)}$	%WT _Y	r_{glu}	%WT _r	$Y_{(P/X)}$	%WT _Y	q_{eth}	%WT _q	$Y_{(P/S)}$	%WT
YEp351/YEp352	0,32±0,08	9,87±1,29	100	3,12	100	4,74±1,14	100	1,50	100	0,40±0,12	100
pMHE7/pMHE8-3	0,24±0,06	11,07±0,41	112	2,71	87	5,87±0,93	124	1,44	96	0,40±0,02	100
YEp351/YEp352	0,43±0,03	8,52±0,89	100	3,68	100	2,74±0,15	100	1,18	100	0,32±0,02	100
pMHE6/pMHE7	0,25±0,02	8,77±3,59	103	2,22	60	2,56±0,99	93	0,65	55	0,28±0,03	88
pMHE6/pMHE22	0,35±0,02	7,38±2,0	87	2,61	71	2,51±0,64	92	0,89	75	0,35±0,04	109

Alle Werte dieser Tabelle basieren auf den Messwerten, aus denen auch die Schaubilder in Abb. 3.4.2.1 hervorgehen. μ_{\max} =Wachstumsrate [1/h], q_{eth} =Ethanolbildungsrate [mg/mg/h], r_{glu} =Glucoseverbrauchsrate [mg/mg/h], $Y_{(S/X)}$ =Glucoseverbrauchs-Koeffizient [mg/mg], $Y_{(P/X)}$ =Ethanolbildungs-Koeffizient [mg/mg] $Y_{(P/S)}$ =Ethanolausbeute-Koeffizient [mg/mg]. Die Ermittlung von μ_{\max} , r_{glu} , q_{eth} und der Y-Werte ist in Abschnitt 2.2.18 beschrieben. Die Veränderung im Teststamm gegenüber dem Wildtyp sind in %WT angegeben, wobei %WT_Y sich auf die Y-Werte bezieht, %WT_r und %WT_q auf die Glucoseverbrauchsrate resp. Ethanolbildungsrate.

Abb. 3.4.2.2 Nachweis von Plasmiden in diploiden Doppeltransformanten

YEpl351	YEpl351	pMHE8-3	pMHE7	pMHE7	pMHE6	pMHE22
<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Pvu</i> II	<i>Pvu</i> II	<i>Pvu</i> II
	5.200	6.300	11.500	7.300	10.400	7.300
4.400		5.000	6.000	4.900	5.300	4.900
1.200		3.600	4.000	4.100	2.300	4.100
		2.200		3.600	1.900	3.600
		1.900			1.500	3.100
		1.500	<100	1.600	<100	
		1.300				
		250				

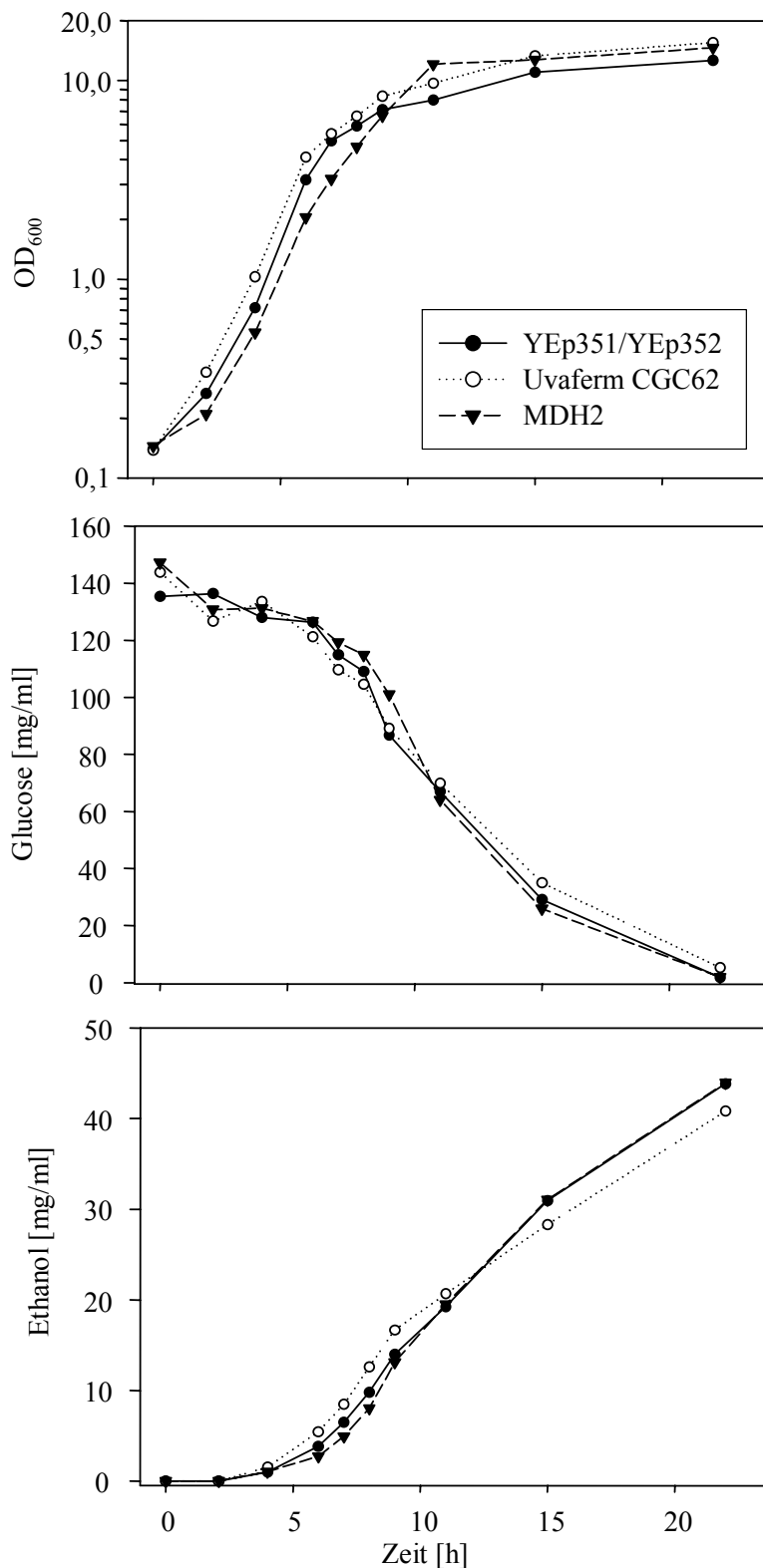
Nachweis der Plasmide in Stämmen mit pMHE6/pMHE7, pMHE6/pMHE22 und pMHE7/pMHE8-3. Obere Photos: 1-6: Isolate aus YEpl351/YEpl352, 7-13 und 21, 22: Isolate aus pMHE6/pMHE7, 14-20 und 23, 24: Isolate aus pMHE6/pMHE22. Unteres Photo: 1-6: Isolate aus YEpl351/YEpl352, 7-16: Isolate aus pMHE6/pMHE7. Standard (S): 1kb-Leiter. Die Tabelle gibt die erwarteten Fragmentlängen in Basenpaaren (bp) für die Restriktionen der Plasmide mit den Erkennungsstellen *Eco*RI und *Pvu*II wieder. Isolierungen aus pMHE7/pMHE8-3 wurden mit *Eco*RI geschnitten, Isolierungen aus pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 wurden mit *Pvu*II geschnitten. In beiden Fällen wurde die Kontrolle (YEpl351/YEpl352) mit *Eco*RI behandelt.

Schließlich wurde auch der Stamm MDH2 (*PGII/pgi1::kanMX pyk1::HIS3/pyk1::HIS3* - pMHE6 pMHE22) im Vergleich zu einem Kontrollstamm (*PGII PYK1* - YEp351 YEp352) und einem Industriestamm (Uvaferm CGC62) auf sein Gärverhalten unter praxisnahen Bedingungen untersucht. Dazu wurde eine filtrierte und verzuckerte Weizenmaische (vgl. Abschnitt 2.1.2.2) mit gleichen Zelldichten angeimpft und vergoren. Hier zeigten sich weder im Wachstum, noch im Glucoseverbrauch oder der Ethanolbildung wesentliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Stämmen (Abb. 3.4.2.3 und Tab. 3.4.2.2). Dies könnte auf einen Verlust der Plasmide unter *in vivo*-Bedingungen zurückzuführen sein. Ein Stabilitätstest für die enthaltenen Plasmide zeigte nach dreimaliger nicht-selektiver Anzucht in Vollmedium (YEED) und einem Vereinzlungsausstrich, dass 50 von 50 Kolonien sowohl auf Mangelmedium ohne Leucin als auch auf solchem ohne Uracil wachsen konnten. Damit lag die Rate eines möglichen Plasmidverlustes unter 2% und scheidet als Ursache für die mangelnde Überproduktion aus.

Tab. 3.4.2.2 Ethanolbildungsraten, Glucoseverbrauchsraten und Ausbeute im Rezipienten MDH2 und Uvaferm CGC62

Stamm	μ_{\max}	$Y_{(S/X)}$	%WT _Y	r_{glu}	%WT _r	$Y_{(P/X)}$	%WT _Y	q_{eth}	%WT _q	$Y_{(P/S)}$	%WT
YEp351/YEp352	0,56±0,05	12,41±5,95	100	6,95	100	4,22±0,7	100	2,36	100	0,40±0,05	100
Uvaferm CGC62	0,57±0,01	15,27±8,51	123	8,70	125	4,54±0,04	108	2,59	110	0,30±0,00	75
MDH2	0,54±0,02	12,83±6,63	103	6,93	100	4,22±0,92	100	2,29	97	0,36±0,22	90

Alle Werte dieser Tabelle basieren auf den Messwerten, aus denen auch die Schaubilder in Abb. 3.4.2.3 hervorgehen. μ_{\max} =Wachstumsrate [1/h], q_{eth} =Ethanolbildungsrate [mg/mg/h], r_{glu} =Glucoseverbrauchsrate [mg/mg/h], $Y_{(S/X)}$ =Glucoseverbrauchs-Koeffizient [mg/mg], $Y_{(P/X)}$ =Ethanolbildungs-Koeffizient [mg/mg] $Y_{(P/S)}$ =Ethanolausbeute-Koeffizient [mg/mg]. Die Ermittlung von μ_{\max} , r_{glu} , q_{eth} und der Y-Werte ist in 2.2.18 beschrieben. Die Veränderung im Rezipient und dem Industriestamm gegenüber dem Wildtyp sind in %WT angegeben, wobei %WT_Y sich auf die Y-Werte bezieht, %WT_r und %WT_q auf die Glucoseverbrauchsraten resp. Ethanolbildungsrate.

Abb. 3.4.2.3 Wachstum, Glucoseverbrauch und Ethanolbildung im Rezipienten MDH2

Der Rezipientenstamm MDH2, der Industriestamm Uvaferm CGC62 und der diploide Kontrollstamm (K18xK39 mit YEp351/YEp352) wurden in Filtrat aus verzuckerter Weizenmaische angezogen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die OD₆₀₀ bestimmt (oben). Sterilfiltrierte Proben wurden tiefgefroren bis zur Analyse mit HPLC, wobei Glucose (Mitte) und Ethanol (unten) detektiert wurden. Die Messwerte wurden als Doppelbestimmung ermittelt.

4 Diskussion

4.1 Konstrukte zur Überproduktion von Glykolyseenzymen

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine Überproduktion aller Glykolyseenzyme zu erreichen und die Auswirkungen auf Wachstum und Ethanolbildung zu untersuchen. Dazu wurden sämtliche Gene, die an der Verstoffwechslung von Glucose zu Ethanol beteiligte Enzyme kodieren, nacheinander in zwei Hochkopienzahl-Vektoren eingebaut (vgl. Abschnitt 3.1). Bei den meisten Konstruktionen kam dabei die PCR-Technik in Verbindung mit der homologen Rekombination in Hefe zum Einsatz. Mit ihrer Hilfe wurden die ausgewählten Glykolysegene aus Präparationen genomischer DNA aus genetisch definierten Hefestämmen amplifiziert und in die Hochkopienzahl-Vektoren eingebaut. Die Anwendung der PCR-Technik ist mit den bekannten Fehlern der DNA-Polymerase behaftet und durch die Auswahl von PCR-Systemen mit Enzymen hoher Qualität und "proof reading"-Funktion wurde diese Fehlerquelle minimiert. Auf eine Sequenzierung der Gene konnte weitestgehend verzichtet werden, da die Funktionalität der Enzyme durch Bestimmung der spezifischen Aktivitäten in Rohextrakten aus Transformanten mit den entsprechenden Plasmiden durchgeführt wurde und für alle Enzyme eine gute bis mäßige Überproduktion festgestellt wurde (Tab. 3.2.1) und somit nur minimale Veränderungen der Originalsequenz zu befürchten sind.

Bei der Auswahl der Oligonukleotide für die Amplifizierung wurde darauf geachtet, dass sie ca. 800 Basenpaare vor dem Startcodon des Leserasters binden. Damit wurde sichergestellt, dass alle regulatorischen Funktionen der ursprünglichen Promotoren erhalten blieben (Heinisch und Hollenberg, 1993). Eine Alternative hätte die Expression jedes einzelnen Gens unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors dargestellt. Dies ist jedoch aufgrund der ausgeprägten homologen Rekombination in *S. cerevisiae* nicht möglich, da hier mit starken Umlagerungen in den plasmidkodierten Sequenzen zu rechnen wäre (Krogh und Symington, 2004).

Der erfolgreiche Einbau jedes neuen Gens in die Hochkopienzahl-Vektoren wurde durch Restriktionsanalysen nach Vergleich der Genkarten des Ausgangsplasmides und des erwarteten Plasmides überprüft. Darüber hinaus zeigten erhöhte spezifische Enzymaktivitäten in entsprechenden Transformanten, dass fast alle Konstrukte zu einer Überproduktion der kodierten Enzyme führten. Eine Ausnahme bildete dabei die Konstruktion von pMHE8-1, das keine erhöhte Enzymaktivitäten für das zuletzt erwartete Genprodukt, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, zeigte (Tab. 3.2.1). Diese Untersuchungen wurden nicht weiter

verfolgt, da *TDH1* das am schwächsten exprimierte Isogen für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ist (McAllister und Holland, 1985) und nach neueren Erkenntnissen auch eher durch reduktiven Stress induziert wird (Valadi *et al.*, 2004). Deshalb wurde es für weitere Untersuchungen durch *TDH2* ersetzt, was aber ebenfalls zu keiner erhöhten Enzymaktivität führte. Um eine fehlerhafte Sequenz ausschließen zu können, wurde pMHE11 (vgl. Abschnitt 3.1.2.1) konstruiert und die enthaltene *TDH2*-Sequenz ermittelt. Dabei konnten keinerlei Abweichungen zur Genomsequenz festgestellt werden. Das Konstrukt pMHE8-3, mit dem alle weiteren Wachstumsversuche und physiologischen Untersuchungen durchgeführt wurden, entstand aus der Ligation des sequenzierten Gens mit pMHE6, allen weiteren Untersuchungen dieser Arbeit muss also die korrekte GapDH zugrunde liegen. Die mangelnde Überexpression auf der Ebene der Enzymaktivität wurde darum eingehender untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.3).

Um die Auswirkungen einer ATP-insensitiven Phosphofruktokinase auf Wachstum und Ethanolbildung von *S. cerevisiae* ermitteln zu können, wurden Untersuchungen mit dem Plasmid pMHE22, das im Rahmen der Bachelorarbeit von D. Palgunow konstruiert wurde (Abb. 3.1.1.10), durchgeführt. Das Vorhandensein des für die ATP-Insensitivität erforderlichen Basenaustausches (Prolin 728 → Leucin) (Rodicio *et al.*, 2000) wurde durch Sequenzierung des Plasmides pMHE41 (vgl. Abschnitt 3.1.2.3) bestätigt. Ein unterschiedliches Verhalten von Transformanten mit pMHE7 (*PFK1 PFK2*) im Vergleich zu pMHE22 (*PFK1_{atp} PFK2 kanMX*) sollte also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf diesen Aminosäureaustausch zurückzuführen sein. Der Einfluss des Gens *kanMX*, das zusammen mit *PFK1_{atp}* in pMHE22 inseriert wurde und in pMHE7 also nicht vorhanden ist, kann bezüglich des Glykolyseflusses eher vernachlässigt werden. Hier könnte durch Verwendung der Cre-Rekombinase die *kanMX*-Kassette aus dem Plasmid entfernt werden, was allerdings im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Die Funktionalität des Hexosetransporters konnte mit den gegebenen Möglichkeiten nicht direkt gemessen werden. Darum wurde auch hier eine Sequenzierung durchgeführt, weshalb pMHE30 konstruiert wurde (vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Es wurden hier Abweichungen von der Genomsequenz gefunden, die zu drei stillen Basenaustauschen und einem Austausch von Tyrosin durch ein Histidin bei Aminosäure 379 führte. Da diese in einem transmembranen Bereich lag, konnte eine Beeinträchtigung der Funktionalität des Enzyms nur durch weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 4.2.3).

4.2 Untersuchungen zur Genexpression *in vivo*

4.2.1 Enzymatische Bestimmungen im Zuge der Konstruktionen der pMHE-Plasmide

Die Konstrukte aus den Vorarbeiten für dieses Projekt bestanden zum größten Teil aus Genen, die aus Genbanken stammen. Dies trifft für die Gene *PFK1*, *PFK2*, *FBA1*, *GPMT* (Tab. 2.1.3.2) zu. Alle anderen Gene wurden mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert, wodurch es zu Mutationen in den Genen kommen konnte. Darum wurde die Überproduktion jedes einzelnen Enzyms nach Insertion eines neuen Gens überprüft und auf die Sequenzierung der meisten Gene konnte darum verzichtet werden. Wie aus Tab. 3.2.1 hervorgeht, konnten für die meisten Enzyme deutliche Überproduktionen um mehr als das Doppelte erzielt werden. Lediglich für *PDC1* und *PGII* konnten mit Faktoren von 1,5 bzw. 1,7 im Vergleich zum Wildtyp nur sehr geringe Überproduktionen erzielt werden. Die Pyruvat-Decarboxylase lieferte keine deutliche Überproduktion in dem Maße, wie sie für *PDC1* auf einem Hochkopienzahl-Vektor in Batch-Kulturen beschrieben worden war (van Hoek *et al.*, 1998). Dort wurde eine maximal dreifache Überproduktion festgestellt, was dort zu keiner Veränderung des Glykolyseflusses führte. Unter der Kontrolle eines *HXT7*-Promotors wurde nur eine maximale Überproduktion um den Faktor 1,2 (Hauf *et al.*, 2000) bzw. 1,1 (Smits *et al.*, 2000) ermittelt. In der vorliegenden Arbeit kam es bei Enzymmessungen bei zunehmender Größe des GlykolysePlasmides zu keiner Veränderung, und pMHE8-3 lieferte eine Überproduktion um den Faktor 1,5 (Tab. 3.2.2).

Die mit dem Faktor 1,7 ebenfalls sehr moderate Überproduktion für Pgi scheint sehr gering im Vergleich zu Berichten, in denen Überproduktionen um den Faktor 7 (Aguilera und Zimmermann, 1986) und 11 (Schaaff *et al.*, 1989) erreicht worden waren. In beiden Untersuchungen war das *PGII*-Gen allerdings das einzige auf einem Hochkopienzahl-Vektor, wohingegen es in dieser Arbeit das fünfte Gen des Plasmides war. Wie aus Tab. 3.2.2 hervorgeht, ist ein Trend zu verzeichnen, wonach mit zunehmender Anzahl Glykolysegene in einem Plasmid die spezifischen Enzymaktivitäten auch vorher stark überproduzierter Glykolyseenzyme sinken. Mit dem Faktor 1,7 liegt Pgi in der gleichen Größenordnung wie Hxk und Pfk, die beide ebenfalls im oberen Bereich der Glykolyse angesiedelt sind. Die Komplementation einer haploiden Segreganten von Y23336 (*MATa pgi::kanMX*) mit dem Plasmid pMHE7 (das u.a. das *PGII*-Gen trägt) unterstützt weiter die Annahme, dass hier kein gravierender Fehler durch die Taq-Polymerase in der PCR-Reaktion eingeführt wurde.

4.2.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei zunehmender Komplexität der pMHE-Plasmide

Nach der Konstruktion der Überproduktionsplasmide wurde anhand von fünf ausgewählten Enzymen untersucht, in wie weit die Plasmidgröße bzw. die Enzymmenge in den Hefezellen sich auf die spezifische Aktivität auswirkt. Für zwei Enzyme der oberen Glykolyse, Hexokinase und Phosphofruktokinase, verringerte sich der Überproduktionsfaktor im Vergleich zum Wildtyp von 4,9 (Hxk) bzw. 4,2 (Pfk) mit einem weiteren integrierten Gen auf 2,6 (Hxk) bzw. 2,1 (Pfk). Nach Insertion eines weiteren Genes wurde dann weniger als das Doppelte der spezifischen Enzymaktivität der Wildtyp-Kontrolle gemessen. Die weitere Vergrößerung der Plasmide führte zu keiner deutlichen Veränderung mehr, die Enzymaktivitäten erreichen also im Verhältnis zur gesamten Proteinmenge einen konstanten Wert.

Das Absinken der Enzymaktivitäten könnte entweder auf die Verringerung der Plasmidkopienzahl in den Transformanten zurückzuführen sein, oder auf Regulationsmechanismen auf transkriptioneller oder translationeller Ebene. Im ersten Fall könnten eventuell auftretende negative Effekte der Überproduktion der Enzyme durch die Selektion auf niedrigere Kopienzahlen pro Hefezelle (und damit eine Absenkung der gebildeten Proteinmenge) ausgeglichen worden sein. Ein Einfluss verschiedener Faktoren auf die Kopienzahl von 2 μ m-Vektoren in Hefen wurde bereits mehrfach diskutiert (Chen *et al.*, 2005).

Wahrscheinlicher scheint allerdings die Regulation auf transkriptioneller Ebene für die Limitierung der Überproduktion der plasmidkodierten Enzyme verantwortlich zu sein. So werden Transkriptionsfaktoren im Allgemeinen nur in begrenzten Mengen von pro- und eukaryontischen Zellen gebildet. Bezüglich der Glykolysegene sind z.B. für *ADHI* Bindestellen für die positiven Regulatoren Gcr1, Rap1, Abf1 beschrieben (Hardy *et al.*, 1992). Entsprechende Bindestellen konnten in der Folge in den Promotoren der meisten Glykolysegene, sowie von Genen der ribosomalen RNA, beschrieben werden (Deminoff und Santangelo, 2001). Es ist daher sehr gut vorstellbar, dass die erhöhte Anzahl der Bindestellen durch die plasmidkodierten Promotoren zu einer Titration der entsprechenden Transkriptionsfaktoren beiträgt. Da diese positiv auf die Transkription wirken, wäre damit eine Absenkung der Transkriptionsrate und letztlich auch der spezifischen Enzymaktivitäten zu erklären.

Die zwei ausgewählten Enzyme der unteren Glykolyse zeigten hingegen keine Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Plasmid- und damit auch der Proteinmenge. Der

Überproduktionsfaktor blieb recht konstant um 2,7 (P_{gk}) bzw. 2,4 (P_{yk}). Die Überproduktion scheint hier also direkt von der Gendosis abhängig zu sein. Allerdings ist hier zu bedenken, dass die untersuchten Konstrukte (pMHE4, pMHE2) bereits 5 bzw. 2 Gene enthielten, bevor *PGK1* bzw. *PYK1* eingebracht wurden. Es könnte damit bereits ein konstanter Wert erreicht worden sein, wie oben bereits diskutiert wurde. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in der Literatur eine deutlich höhere Überproduktion von P_{gk} beschrieben werden konnte (van der Aar *et al.*, 1992)

Erst Untersuchungen in Stämmen mit beiden Plasmiden, auf denen alle Glykolysegene vorhanden waren, ermöglichten ein Gesamtbild der Enzymaktivitäten der Glykolyse Schritte in Überproduzenten (Tab. 3.2.3). Für die Untersuchungen wurden die Plasmidkombinationen pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 gewählt. Dabei wurde statt pMHE8-3 das Vorgängerkonstrukt pMHE6 (d.h. ohne *TDH*-Gen) gewählt, da weder *TDH1* noch *TDH2* in den Vorkonstrukten zu einer Überproduktion der kodierten Isoenzyme geführt hatten (Tab. 3.2.1). Aber auch allgemein konnte in den Doppeltransformanten für die meisten Proteine keine deutliche Überproduktion mehr nachgewiesen werden. Das einzige Enzym, das in beiden Plasmidkombinationen deutlich überproduziert wurde, ist die Enolase (1,9- und 3,0-fach in Tab. 3.2.3). Dies steht mit Beobachtungen in Einklang, wonach *ENO2* durch Glucose-6-phosphat induziert werden kann (Müller *et al.*, 1995). Die leichte Überproduktion von Hxk2 könnte zu einer Erhöhung der Konzentration dieses Metaboliten führen und damit eine Induktion von *ENO2* auf transkriptioneller Ebene erklären. Auch die restlichen Enzyme der unteren Glykolyse von der Phosphoglyceratkinase bis zur Pyruvatkinase werden mit Faktoren um 2,0 noch leicht überproduziert. Hieraus könnte eine ähnliche transkriptionelle Regulation der entsprechenden Promotoren abgeleitet werden.

Die Enzyme der oberen Glykolyse hingegen bestätigen die Ergebnisse aus den Untersuchungen, die in Tab. 3.2.2 wiedergegeben sind und zeigen keine oder nur moderate Überproduktionen mit Faktoren zwischen 0,9 (P_{fk} in pMHE7) und 1,9 (F_{ba1} in pMHE22).

Im gärungsspezifischen Teil wurde für die Plasmidkombination pMHE6/pMHE7 eine Erniedrigung der *PDC1*-Aktivität ermittelt (Faktor 0,7). Mit der Plasmidkombination pMHE6/pMHE22 jedoch lag die Überproduktion mit dem Faktor 1,2 deutlich höher. Da der einzige Unterschied bei den Plasmidkombinationen darin besteht, dass in pMHE22 *PFK1* durch *PFK1_{atp-kanMX}* ersetzt ist, könnte man eine Abhängigkeit der Aktivität von Pdc1 von der Wirkung der P_{fk} vermuten. Die beschriebene Induktion von Glykolysegenen infolge der sukzessiven Erhöhung der Metabolitkonzentrationen (Boles *et al.*, 1993) kam hier scheinbar nicht zum Tragen, was darauf schließen lässt, dass es in Transformanten mit

Glykolyseplasmiden zu keiner Erhöhung der Metabolitkonzentrationen kommt. In gleicher Weise trifft dies für *ADHI* zu, das eine etwas stärkere Überproduktion um den Faktor 1,6 zeigte. Die zum Nachweis dieser Hypothese notwendigen Messungen der intrazellulären Metabolitkonzentrationen in den entsprechenden Transformanten hätten den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Industriestämme zeigten unter gleichen Wachstumsbedingungen keine erheblichen Abweichungen in den Enzymaktivitäten (Tab. 3.2.4) im Vergleich zu Transformanten mit pMHE6/pMHE7 und der Kontrolle mit YEp351/YEp352. Uvaferm CGC62 und SIHA Aktiv-Hefe 6 lagen mit allen Enzymaktivitäten ca. 20% unter bzw. über der Kontrolle. Die maximale Abweichung betrug 50% für Hxk2 in SIHA Aktiv-Hefe 6. Insgesamt war kein Trend zu erkennen, der auf ein hervorstechendes Charakteristikum von Industriestämmen schließen lassen könnte. Die besondere Eignung von Stämmen zur industriellen Herstellung von Ethanol scheint also nicht auf veränderte Enzymaktivitäten in der Glykolyse zu beruhen. Allerdings ist hier zu beachten, dass in den Messungen der spezifischen Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Versuchen erhebliche Schwankungen auftraten, sodass zu einer statistischen Absicherung noch eine größere Anzahl von Messungen durchgeführt werden müsste.

Zusammenfassend lässt sich aus den Enzymaktivitätsdaten ableiten, dass die Überproduktion sämtlicher Enzyme der Glykolyse im Vergleich zur getrennten Überproduktion einzelner Glykolyseenzyme relativ gering ausfällt.

4.2.3 Komplementation von Glucosetransport-Mutanten und Bestimmung der mRNA-Konzentration von *HXT1* und *TDH2*

Da die Überproduktion des Hexosetransporters mit der vorhandenen Laboreinrichtung nicht direkt gemessen werden konnte und außerdem ein PCR-bedingter Aminosäureaustausch in einem transmembranen Bereich vorlag, wurde zunächst die Funktionalität des Transporters getestet. In einem Komplementationstest konnte für den Stamm EBY4000, in dem alle für Hexosetransporter kodierenden Gene deletiert sind, das Wachstum durch Transformation mit pMHE8-3 wiederhergestellt werden. Für Hexosetransporter besteht ein komplexes Regulationssystem, das je nach Konzentration der verfügbaren Kohlenstoffquelle zwischen Transportern mit niedriger, mittlerer und hoher Affinität wählt (Boles und Hollenberg, 1997). Die Regulation läuft dabei auf transkriptioneller und translationeller Ebene ab. Darüber hinaus können im Rahmen der Katabolit-Inaktivierung auch posttranslationelle Mechanismen, wie z.B. die Proteolyse, eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription von *HXT1* unter die Kontrolle des *ADHI*-Promotors gestellt. Dieses Konstrukt

machte die Expression von *HXT1* unabhängig von den erstgenannten Regulationsmechanismen, was in einer um den Faktor 14 erhöhten Transkription von *HXT1* resultierte (vgl. Abschnitt 3.2.6). Hieraus lässt sich in erster Näherung auf einen erhöhten Hexosetransport in den entsprechenden Transformanten schließen. Ein unmittelbarer Abbau der Enzyme durch Katabolit-Inaktivierung oder ähnliche Mechanismen ist unwahrscheinlich, da diese bei Glucosegabe zu aerob wachsenden Zellen zu beobachten sind und in erster Linie auf Enzyme der Gluconeogenese und der Atmungskette wirkt. Zwar werden auch Transportsysteme angesprochen, jedoch solche, die bei geringer Hexosekonzentration im Medium transkribiert werden, also nur für die "high-affinity"-Transporter, die von *HXT6* und *HXT7* kodiert werden (Krampe *et al.*, 1998). Die Komplementationstests ließen darüber hinaus für Transformanten mit pMHE8-3 (*ADH1p-HXT1*) ein vergleichbares Wachstum auf Glucose im Vergleich zu Maltose erkennen (Abb. 3.2.5). Das Fehlen der Hexosetransporter in EBY4000 ist also vollständig durch das verwendete Konstrukt kompensiert und eine zu knappe Versorgung der Glykolyse mit Glucose war nicht zu befürchten.

Die spezifische Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wurde in Transformanten mit dem plasmidkodierten *TDH2*-Gen im Gegensatz zu den anderen Enzymen nicht erhöht. Die erhöhte Gendosis führte im Falle der *TDH2* zu einer Erniedrigung der spezifischen Transkriptionsrate auf etwa ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Effekt weist auf verringerte Transkription oder einen schnelleren Abbau der mRNA hin. Die Transkription von *TDH1-3* ist vom generellen Transkriptionsfaktor der Glykolyse (Gcr1) abhängig und die Deletion *gcr1* führt zu einem 50fachen Rückgang der mRNA für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Holland *et al.*, 1987). Durch die Menge an vorhandenen Glykolysegenen, die Bindestellen für Gcr1 besitzen (Tab. 1.1.1) kann es zu einem Austitrieren dieses Transkriptionsfaktors kommen. Dies würde bedeuten, dass die Transkription von *TDH*-Genen in erhöhtem Masse vom Faktor Gcr1 abhängig ist. Als weiterer Transkriptionsfaktor im *TDH2*-Promotor ist Rap1 bekannt, das einerseits elementar für die Transkription ist (McNeil *et al.*, 1990), andererseits auch als bekanntes Element in UAS in Kombination mit anderen Faktoren wie Gcr1 zur Regulation der Transkription beiträgt (Uemura *et al.*, 1997; Scott und Baker, 1993). Ein Austitrieren von Rap1 ist also ebenso denkbar. Für *TPII* wurden Wechselwirkungen zwischen Rap1, Gcr1 sowie Reb1 als Voraussetzung für die Transkription beschrieben (Scott und Baker, 1993). Eine für *TDH2* spezifische Interaktion dieser und eventueller weiterer Transkriptionsfaktoren, die für die konstitutive Expression sorgen, könnte durch allgemeines Austitrieren zu einer verringerten Transkription von *TDH2* führen. Interessanterweise konnte für Rap1 auch eine wichtige Funktion an anderen Bindestellen im Hefegenom, wie an den Promotoren ribosomaler RNA-

Gene und an Telomeren gezeigt werden (Smogorzewska und de Lange, 2002). Eine Titration dieses Faktors könnte also auch hierdurch die negativen Effekte auf das Wachstum entsprechender Transformanten erklären.

4.3 Konstruktion eines diploiden Rezipienten zur Plasmidselektion auf komplexen Medien

Zur Konstruktion eines diploiden Rezipienten wurde pMHE6 statt pMHE8-3 eingesetzt, da eine Überexpression von *TDH2* weder in den Enzymtests (vgl. Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.3), noch in den Transkriptionsmessungen (vgl. Abschnitt 3.2.6) zu erkennen war. Da für pMHE8-3 im Verhältnis zur Kontrolle mit Leervektoren sogar geringere Transkriptmengen für *TDH2* gemessen wurden, konnte bei Anwendung von pMHE6 somit mit einer höheren Aktivität von GapDH *in vivo* gerechnet werden.

Ziel der Konstruktion eines diploiden Rezipienten war ein für *pgi1* und *pyk1* homozygoter Stamm, der erst durch Komplementation über die Plasmide pMHE6 (*PYK1*) und pMHE22 (*PGII*) auf Hexosen wachsen kann und somit autoselektiv ist. Wie aus Abb. 3.3.1 hervorgeht, ist der erhaltene Stamm MDH (R2) nur für *pyk1* homozygot, für *pgi1* ist er heterozygot. Hieraus leitet sich also ausschließlich eine Autoselektion auf pMHE6 ab. Die Anwesenheit der Plasmide pMHE22 (*PGII*) und pMHE6 (*PYK1*) wurde in den Untersuchungen gesondert überprüft und mittels PCR-Technik nachgewiesen (Abb. 3.3.2). Das genomische Wildtypgen *PGII* hat also in den vorliegenden Untersuchungen nicht zum Verlust von pMHE22 geführt. Trotzdem sollte für weitergehende Untersuchungen ein doppelt homozygoter Stamm verwendet werden.

4.4 Untersuchungen zu Wachstum und Glykolysefluss

4.4.1 Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf das Wachstum

Bei der Untersuchung haploider Transformanten konnte gezeigt werden, dass Stämme mit einem Glykolyseplasmid und einem Leervektor sich in der Wachstumsrate bzw. in der Generationszeit kaum von der Kontrolle mit zwei Leervektoren unterscheiden (Abb. 3.4.1.1). Dies galt auch für die zwei Kombinationen YEp352/pMHE6 und YEp352/pMHE8-3, obwohl beide *PYK1* beinhalten, das bei Überexpression zu einem verringerten Wachstum führt (Boles, 1997). Für die negative Korrelation von Wachstum und Gendosis könnten zwei Mechanismen verantwortlich sein: Erstens kommt es im speziellen Fall von *PYK1* bei der Überproduktion auf Hochkopienzahl-Vektoren über einen bisher ungeklärten Mechanismus zu einer verringerten mRNA-Bildung und damit zu einer geringeren Wachstumsrate (Moore *et al.*, 1990c). Zweitens führt eine erhöhte Expression von *PYK1* nicht im gleichen Umfang zu

einer Erhöhung der Enzymaktivität von Pyruvatkinase. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer Translationskontrolle, die durch eine Sequenz von 27 bp vor dem Startcodon auf der mRNA vermittelt wird (Moore *et al.*, 1990b). Die Ersetzung des Promotors von *PYK1* mit diesem "5'-leader" durch den Promotor von *PGK1* führten zu einer massiven Überproduktion von Pyruvatkinase ohne die negative Auswirkungen auf das Wachstum. In den vorliegenden Untersuchungen konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums durch die Überexpression von *PYK1* beobachtet werden. Auch die spezifischen Enzymaktivitäten der Pyruvatkinase überproduzierenden Stämme war mit Faktoren von 1,9 und 2,4 im Vergleich zu anderen Enzymen (Tab. 3.2.2 für pMHE6 bzw. pMHE8-3) eher überdurchschnittlich. Inwieweit eine Deletion des "5'-leaders" sich im Rahmen der Überexpression aller Glykolysegene auf das Wachstum auswirkt, wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Der beobachtete Trend, dass Doppeltransformanten mit zwei großen Glykolyseplasmiden deutlich geringeres Wachstum zeigen als solche mit nur einem Glykolyseplasmid und einem Leervektor lässt vermuten, dass negative Auswirkungen der Überproduktion verschiedener Gene additiv sind.

Im Gegensatz zu den haploiden Zellen zeigten diploide Doppeltransformanten auch für Kombinationen von "Leervektoren" und Glykolyseplasmiden einen deutlichen Rückgang der Wachstumsrate μ auf 86 bzw. 87% gegenüber der Kontrolle (YEp351/YEp352) (Abb. 3.4.1.2). Über die Kombinationen pMHE1/pMHE2, pMHE3/pMHE4, pMHE5/pMHE6 nahm μ auf 72, 63 bzw. 51% ab und lag für pMHE6/pMHE7 wieder bei 63%. Dies bestätigt, dass die Plasmidgröße oder die Anzahl der plasmidkodierten Gene einen Einfluss auf das Wachstum hat. Eine denkbare Erklärung ist die energetische Belastung durch die erhöhte Proteinproduktion, die auch oft als "metabolic burden" oder "protein burden" bezeichnet wird. Der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus ist von der "critical rate of protein synthesis" (CRPS) abhängig. Eine minimale Proteinbildungsrate bildet damit die Voraussetzung zum Start der S-Phase (Willis *et al.*, 2003). Diese Kontrolle könnte durch die Überproduktion der Glykolyseenzyme empfindlich gestört sein und somit das Wachstum negativ beeinflussen.

Durch die unterschiedlichen Überproduktionsergebnisse für die verschiedenen Gene bei gleicher Gendosis wird klar, dass es in der Bildung jedes Enzyms kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Transformanten und Wachstumsbedingungen geben muss. Damit könnte die gesamte Glykolyse beeinflusst werden, da die Konzentrationen der Metabolite sich dann ändern, was wiederum Auswirkungen auf die Selbstinduktion der unteren Glykolyse hätte (Schehl *et al.*, 2004).

4.4.2 Einfluss der Überexpression verschiedener Gene auf den Glykolysefluss

Die Überproduktion von Glykolyseenzymen führte generell zu einer Verlangsamung des Wachstums. Messungen der Glucoseverbrauchsrate und der Ethanolbildungsrate wurden durchgeführt um zu sehen, inwiefern dieses Verhalten einen veränderten Glykolysefluss zur Folge hat.

Die Daten aus Tab. 3.4.2.1 zeigen, dass Wachstum und Glykolysefluss eng miteinander korrelieren. In allen drei angeführten Transformanten mit Glykolyseplasmiden sinkt die Wachstumsrate μ , während sich der Glucoseverbrauchs-Koeffizient nur gering ändert und für pMHE6/pMHE7 fast unverändert bleibt, für pMHE7/pMHE8-3 ist er um 12% höher, in pMHE6/pMHE22 um 13% niedriger. Die hier beobachteten Variationen sind auf die inherenten statistischen Schwankungen bei solchen Messungen zurückzuführen und können nicht als signifikant angesehen werden. Dies gilt auch für die Glucoseverbrauchsrate, wo die Transformanten 60 und 87% im Vergleich zur Kontrolle erreichen. Der Ethanolbildungs-Koeffizient ist in der Kombination pMHE7/pMHE8-3 um 24% erhöht, in pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 dagegen um weniger als 10% erniedrigt. In den Ethanolbildungsraten schlägt sich das so nieder, dass für pMHE7/pMHE8-3 mit 93% fast das Kontrollniveau erreicht, für pMHE6/pMHE7 und pMHE6/pMHE22 jedoch sinkt q_{Eth} aufgrund des langsamen Wachstums auf 55 bzw. 75%.

Eine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit infolge der Änderung der Glucoseverbrauchs-Koeffizienten $Y_{(S/X)}$ oder der Ethanolbildungs-Koeffizienten $Y_{(P/X)}$ ist aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich. Vielmehr bestätigten die Ausbeute-Koeffizienten $Y_{(P/S)}$ von $\pm 10\%$, dass es zu keiner Änderung des Glykolyseflusses zugunsten der Ethanolbildung kam. Bemerkenswert jedoch ist der deutliche Unterschied der Ausbeute-Koeffizienten $Y_{(P/S)}$ der Transformanten, die sich nur durch die ATP-Sensitivität der Phosphofruktokinase unterschieden, ansonsten aber über die gleichen Gene auf den Überproduktionplasmiden verfügten. Die Transformante pMHE6/pMHE7 mit einer ATP-sensitive Pfk zeigte einen um 12% erniedrigten Ausbeute-Koeffizient $Y_{(P/S)}$, während dieser in der Transformante pMHE6/pMHE22 mit der ATP-insensitiven Pfk um 9% sank. Die dazugehörigen Wachstumskurven (Abb. 3.4.2.1) lassen für pMHE6/pMHE22 ein besseres Wachstum erkennen, was sich auch in der um 40 % höheren Wachstumsrate (Tab. 3.4.2.1: $0,35 \text{ h}^{-1}$ und $0,25 \text{ h}^{-1}$) niederschlägt. Für Deletionen von *PFK1* oder *PFK2* ist bekannt, dass sie die Induktion der Gene *CLN3*, *BCK2* und *CDC25*, die für den Übergang von G1- in die S-Phase elementar sind, blockieren (Newcomb *et al.*, 2003). Die Autoren vermuten außerdem, dass die

Glykolyse selbst ein Signal zur Regulation der Transkription dieser und anderer Gene gibt und dies über einen weiteren Weg geschieht, über den bisher allerdings noch nichts bekannt ist. Die hier vorgelegten Daten könnten in diesem Zusammenhang so interpretiert werden, dass eine ATP-insensitive Phosphofruktokinase in geringerem Umfang die Transkription von Genen blockiert, die den Zellzyklus steuern. Der Eintritt in die S-Phase würde somit schneller ablaufen, was zu einer höheren Wachstumsrate führen würde.

Bei den Wachstumsversuchen des Rezipienten MDH2 (R2) und dem Industriestamm Uvaferm CGC62 in filtrierter Maische ist auffällig, dass MDH2 (*pgi1*, *pyk1* pMHE6/pMHE22), die Kontrolle mit YEp351/YEp352 und Uvaferm CGC62 in allen untersuchten physiologischen Parametern sehr ähnliche Werte zeigten. Für alle 3 Kulturen wurden wesentliche höhere Wachstumsraten als in synthetischem Medium ermittelt und für YEp351/352 betrug sie z.B. $0,56 \text{ h}^{-1}$ statt $0,43 \text{ h}^{-1}$, was auf eine bessere Versorgung der Zellen im komplexen Medium Maische zurückzuführen ist. Weder der Glucoseverbrauchs-Koeffizient $Y_{(S/X)}$, noch der Ethanolbildungs-Koeffizient $Y_{(P/S)}$ waren zwischen den drei Stämmen signifikant unterschiedlich, allerdings waren die Glucoseverbrauchsrate r_{glu} und die Ethanolbildungsrate q_{eth} fast doppelt so hoch wie in synthetischem Medium. Dies lässt sich weitgehend auf die erhöhten Wachstumsraten zurückführen. Die Ausbeute-Koeffizienten $Y_{(P/S)}$ lagen hingegen im gleichen Bereich, obwohl $Y_{(P/S)}$ von Uvaferm CGC62 nur bei $0,3 \text{ g/g}$ lag, also nur 75% im Vergleich zur Kontrolle ($0,4 \text{ g/g}$) erreichte. Dies deutet darauf hin, dass Industriehefen sich nicht durch besonders hohe Ausbeute-Koeffizienten auszeichnen. Gestützt durch die gemessenen Enzymaktivitäten, die in Industriestämmen für kein Glykolyseenzym eine besonders erhöhte oder erniedrigte Enzymmenge erkennen ließen (vgl. Abschnitt) und um maximal 20% abweichen, lässt sich die besondere Eignung von Industriehefen also nicht auf einen erhöhten Glucoseumsatz zurückführen. Eine Erhöhung der Ethanolausbeute ist außerdem nur in sehr begrenztem Ausmaß denkbar, da Wildtyp-Hefen mit $0,4 \text{ g Ethanol/g}$ verbrauchter Glucose schon recht nahe am theoretischen Maximalwert von $0,51$ ($2 \times 46 \text{ g/mol}$ (Ethanol)/ 180 g/mol (Glucose)) sind. Dieser ist in wachsenden Kulturen natürlich nicht erreichbar, da Glucose auch zum Aufbau von Zellwandbestandteile und von Speicher- und Stressschutzstoffen dient (Abb. 1.1.2). Aus diesem Grund werden bei der alkoholischen Gärung in der Regel Bedingungen gewählt, die nur noch ein begrenztes Hefewachstum erfordern.

Der Glykolysefluss sinkt im Laufe der Gärung und erreicht bei 6,5 %vol bereits nur noch 50% des Ausgangswertes (Dombek und Ingram, 1987). Aus technologischer Sicht scheint eine weitere Erhöhung des Trockensubstanzgehaltes in Maischen vor diesem Argument wenig

sinnvoll, da sich die Gärdauer extrem verlängert. Dennoch wird in der industriellen Ethanolproduktion trotz verlängerter Gärzeiten und Ausbeuteverlusten eine Erhöhung der Ethanolkonzentration am Ende der Gärung angestrebt. Dieses Vorgehen ist allerdings auf die Reduzierung der Maischemenge und die damit verbundene Senkung des Energieaufwandes bei der Destillation und der Trocknung der Schlempe zurückzuführen und damit letztlich ein ökonomischer Grund. Diese Entwicklung hat zur Suche nach Stämmen mit hoher Ethanoltoleranz geführt und inzwischen wurden Stämme beschrieben, die bis 18 %vol noch metabolisch aktiv sind (Lin und Tanaka, 2006). Eine moderate Erhöhung des Glykolyseflusses bei hohen Ethanolkonzentrationen könnte sich in solchen Stämmen allerdings noch immer positiv auf die Gärzeit auswirken. Der Rezipientenstamm MDH2 ist mit seinen autoselektiven Plasmiden in komplexen Medien wie Getreidemaische ein geeignetes Objekt für weitergehende Untersuchungen in dieser Richtung.

4.4.3 Allgemeine Betrachtungen und Ausblick

Aus den hier erhaltenen Ergebnissen lässt sich folgern, dass eine gleichzeitige Überproduktion aller zur alkoholischen Gärung notwendigen Enzyme durch eine einfache Erhöhung der Gendosis in Hefe nicht möglich ist. Die spezifischen Enzymaktivitäten erhöhen sich unterschiedlich stark und liegen unter dem Faktor 2. Insbesondere die GapDH konnte nicht zur Überproduktion gebracht werden, so dass eine Überproduktion aller Glykolyseenzyme nicht festgestellt werden konnte. Gerade dies kann nach der Theorie der MCA ("Metabolic Control Analysis", vgl. Abschnitt 1.5), die alle an einem Stoffwechselweg beteiligten Enzyme einbezieht, aber entscheidend sein. Dies verdeutlicht das Beispiel der Biosynthese des Tryptophans. Hier wurden alle fünf spezifischen enzymatischen Schritte einzeln und in Kombinationen überproduziert. Bei bis zu vier gleichzeitig überproduzierten Enzymen konnte keine vermehrte Produktion von Tryptophan gemessen werden, erst bei gleichzeitiger Überproduktion aller fünf Schritte stieg die Produktionsrate um das 8,8 fache an (Niederberger *et al.*, 1992). Das war viermal mehr, als aufgrund der Aufsummierung der für die einzelnen Enzyme in Überexpressionsversuchen ermittelten Kontroll-Effekte zu erwarten gewesen wäre. Ein vergleichbarer Effekt für die Glykolyse konnte in dieser Arbeit wegen der mangelnden Überproduktion von GapDH also weder bestätigt noch widerlegt werden. Aufgrund der zentralen Stellung der Glykolyse im Stoffwechsel (Abb. 1.1.3) ist dies jedoch weniger wahrscheinlich, da im Beispiel der Tryptophansynthese für die fünf spezifischen Enzyme ein gesamter Kontroll-Koeffizient von 0,258 ermittelt wurde, also $\frac{1}{4}$ der Kontrolle durch diese Gruppe von Enzymen ausgeübt wurde. Für die Glykolyse wäre aufgrund der mannigfaltigen Verknüpfungen (Abb. 1.1.3) eine viel geringere Kontrolle durch die

Glykolyseenzyme zu vermuten, so dass deren Überproduktion auch nur eine sehr geringe Kontrollwirkung auf den Glykolysefluss hätte. Konkrete verlässliche Werte für Kontrollkoeffizienten sind bislang jedoch sehr begrenzt verfügbar (Fraenkel, 2003).

Die gleichzeitige geringe Überproduktion vieler Glykolyseenzyme in der vorliegenden Arbeit bestätigt frühere Untersuchungen, in denen die Überproduktion beider allosterischer Enzyme der Glykolyse, der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase (Schaaff *et al.*, 1989), bzw. des gesamten unteren Teils der Glykolyse (Smits *et al.*, 2000), ebenfalls zu keiner Erhöhung der Ethanolbildungsrate führten. Der Glykolysefluss scheint also weniger durch die Enzymmenge, als viel mehr auf allosterischer Ebene beeinflusst zu werden. Darüber hinaus mehrten sich die Anz.-eichen, dass die allosterische Kontrolle des Glykolyseflusses nicht nur von den klassischen Enzymen Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase abhängt, sondern ganz im Sinne der MCA zumindest Hexokinase und Enolase noch eine Rolle spielen (Larsson *et al.*, 2000). Dabei scheinen diese Enzyme über die Verknüpfung mit dem Energiestoffwechsel zu wirken, wie in Untersuchungen von permeabilisierten Zellen, die eine starke negative Abhängigkeit des Glykolyseflusses von der ATP-Konzentration aufwiesen, gezeigt wurde. Die Autoren sahen die Wirkung von ATP im Sinne der MCA auf mehrere Enzyme verteilt, stellten jedoch keine konkreten Berechnungen an. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einem rein theoretischen Ansatz, bei dem auf Grundlage der MCA der Einfluss verschiedener Merkmale des Energiestoffwechsels auf den Glykolysefluss in Muskelzellen mathematisch beschrieben wurden (Thomas und Fell, 1998). Den Berechnungen zufolge üben die Hemmung der ATPase durch ADP, die Aktivierung von Phosphofruktokinase durch AMP und das Verhältnis ATP/ADP die stärkste Kontrolle aus. Diese Resultate decken sich nach Angabe der Autoren auch mit Resultaten aus anderen Untersuchungen. In einem gewissen Umfang scheint eine Beschreibung der Kontrolle der Glykolyse also möglich, jedoch basieren die Berechnungen in diesem vereinfachten Modell auf abgeschätzten Werten für die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von Substrat, Produkt und Effektoren.

Relativiert wird die Erwartung eines ähnlichen Effektes wie bei der Tryptophansynthese (s.o.) auch durch die Problematik, dass *in vitro* ermittelte Enzymaktivitäten nicht den *in vivo* vorherrschenden Werte entsprechen müssen. Dies macht die Anwendung der MCA bisher noch schwierig, weil auf abgeschätzte Enzymaktivitäten und Einflüsse auf die Enzyme zurückgegriffen werden muss. Für die Glykolyse wurden die spezifischen Enzymaktivitäten *in vitro* gemessen und die Konzentration der Metabolite und der Fluss der Glykolyse berechnet. Bei einem Vergleich zwischen den später bestimmten Metabolitkonzentrationen und dem Glykolysefluss kamen nur die Hälfte der untersuchten Enzyme relativ nahe (Faktor

2) an die vorhergesagten Werte heran (Teusink *et al.*, 2000). In einer weiteren Anwendung wurde für Chemostat-Kulturen ein Modell auf Grundlage der "Metabolic flux analysis" (MFA) erstellt (Nissen *et al.*, 1997), mit dem der Fluss in einem Netzwerk von 37 Enzymreaktionen (Glykolyse und angrenzende Wege) gemessen und berechnet werden konnte. Ein solches Modell könnte auf Grundlage von physiologischen Messungen die Flüsse der intrazellulären Stoffwechselwege bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen quantitativ beschreiben und somit Ansatzpunkte für gezielte genetische Manipulationen liefern.

Aufgrund der geringen Daten zu Enzymaktivitäten und Kontroll-Koeffizienten *in vivo* und der komplexen Verknüpfung der Glykolyse im Stoffwechsel der Zelle sind die Modelle aber noch nicht weit genug gereift, um aus ihnen brauchbare Strategien zur Erhöhung des Glykolyseflusses bzw. der Ethanolbildungsrate in *S. cerevisiae* ableiten zu können.

Der in dieser Arbeit begangene Ansatz, eine Überexpression aller Glykolyseenzyme mitsamt der nativen Promotoren mit Hilfe von Hochkopienzahl-Vektoren herbeizuführen, führte zu keiner deutlichen Erhöhung der Enzymaktivitäten und zu keiner Beschleunigung des Glykolyseflusses. Der Versuchsansatz könnte durch die gleichzeitige Überproduktion der allgemeinen Transkriptionsfaktoren für die Glykolyse, Gcr1, Gcr2, Rap1 sowie Reb1 und Abf1 unterstützt werden, um einem Austitrieren durch die deutlich erhöhte Gendosis vorzubeugen. Die Deletion der Sequenz im Promotor von *PYK1*, die die translationelle Kontrolle der Pyruvatkinase bewirkt (Boles, 1997), könnte eine weitere Möglichkeit bieten, das Wachstum von Transformanten mit pMHE-Plasmiden zu beschleunigen.

Von besonderer Bedeutung scheint die Regulation der Transkription der *TDH*-Gene. Für *TDH2* und *TDH3* wurde der Anteil an der Aktivität der GapDH auf 25-30% bzw. 50-60% geschätzt (McAllister und Holland, 1985). Alle *TDH*-Gene gelten als konstitutiv und der Promotor des am stärksten transkribierten Gens *TDH3* wird aufgrund dieser Eigenschaft erfolgreich in der heterologen Genexpression verwendet (Kuroda *et al.*, 1994). In der Literatur ist bisher keine erfolgreich erhöhte Expression von *TDH2* oder *TDH3* beschrieben und auch unter einem starken *HXT7*-Promotor konnte keine deutliche Überproduktion von *TDH3* erzielt werden (Smits *et al.*, 2000). Die Überexpression von *TDH1* mit Hochkopienzahl-Vektoren in dieser Arbeit war genauso wenig möglich wie die von *TDH2* (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die Feststellung, dass schon die Erhöhung des Transkripts nicht möglich war (vgl. Abschnitt 3.2.6), macht einen starken Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene wahrscheinlich. Entsprechende Arbeiten zur Erklärung dieser Befunde wurden im Rahmen einer sich im Labor anschließenden Diplomarbeit bereits in Angriff genommen.

5 Zusammenfassung

Die Wein-, Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der Hauptproduzent in der weltweiten Alkoholproduktion. Im Rahmen der Untersuchungen zur Bioethanolproduktion sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Überproduktion aller am Glucoseumsatz der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beteiligten Enzyme *in vivo* untersucht werden, um die Möglichkeit einer beschleunigten Ethanolproduktion zu eröffnen.

Hierzu war von Vorteil, dass *S. cerevisiae* sowohl klassisch-genetisch als auch molekulargenetisch zu den bestuntersuchten eukaryontischen Organismen zählt. So standen zwei verschiedene Hochkopienzahl-Vektoren zur Verfügung, in die im ersten Teil der Arbeit jeweils die Hälfte der zu exprimierenden Gene eingesetzt werden konnten. Dies erfolgte in den ersten Schritten durch Restriktion und Ligation und im weiteren Verlauf durch eine Kombination der PCR-Technik zur Amplifikation der in Frage kommenden Genomfragmente mit der effizienten homologen Rekombination *in vivo*. So wurden sowohl das Gen für einen Hexosetransporter (*HXT1*), als auch alle für die Glykolyseenzyme kodierenden Gene (*HXK2*, *PGII*, *PFK1*, *PFK2*, *FBA1*, *TPII*, *TDH1* bzw. *TDH2*, *PGK1*, *GPM1*, *ENO2*, *PYK1*) und die für die abschließenden Schritte der Umwandlung von Pyruvat in Ethanol kodierenden Gene (*PDC1*, *ADHI*) kloniert. Nach Isolierung aus der Hefe wurden die entsprechenden Plasmide anschließend in *E. coli* amplifiziert und Restriktionsanalysen unterzogen. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in Extrakten aus entsprechenden Hefetransformanten ergab eine leichte Überproduktion (Faktor 1,5 bis 3,0) für alle Enzyme mit Ausnahme der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase. Für *HXT1* wurde eine deutlich erhöhte Transkriptionsrate (Faktor 14 im Vergleich zum Ausgangsstamm) als Indiz für die tatsächliche Überproduktion gewertet. In den enzymatischen Messungen zeigte sich eine deutliche Tendenz zur Senkung der Überproduktion mit zunehmender Zahl der plasmidkodierten Gene. Hieraus läßt sich eine negative Rückkopplung in Bezug auf die Regulation des Glykolyseflusses ableiten.

Untersuchungen der Wachstumsraten im zweiten Teil der Arbeit zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion mit Zunahme der exprimierten Gene. In Bezug auf die physiologischen Parameter führte dies letztlich zu gleichbleibenden Glucoseverbrauchs- und Ethanolbildungs-Koeffizienten relativ zur Wildtyp-Kontrolle bei vergleichbaren Ausbeutekoeffizienten. Interessanterweise führte die Aufhebung der ATP-Hemmbarkeit im Phosphofruktokinase-Schritt durch die Expression eines Mutantenallels von *PFK1* zu einem verbesserten

Wachstum ansonsten isogener Transformanten. Dieses Ergebnis unterstützt die physiologische Bedeutung der allosterischen Regulation in diesem zentralen Glykolyse-schritt.

Ein Verlust glykolytischer Enzymaktivitäten in Deletionsmutanten führt bei *S. cerevisiae* in der Regel zur Wachstumshemmung. Daher wurde in einem weiteren Teil der Arbeit mit der Konstruktion eines Hefestammes begonnen, bei dem allein die Anzucht mit verschiedenen Zuckerquellen selektiv für den Erhalt der Überproduktionsplasmide sein sollte. Hierzu wurde ein Stamm mit einer *pgi1*-Deletion mit einem *pyk1*-Deletionsstamm gekreuzt und einer Tetradenanalyse unterzogen. Erste Versuche mit Zwischenkonstrukten deuten hier bereits auf eine deutliche Erhöhung der Plasmidstabilität nach Anzucht auf komplexen Medien hin.

Aus der vorliegenden Arbeit leiten sich wertvolle Erkenntnisse über die Regulation des Glykolyseflusses *in vivo* ab, die die Basis für weitere Untersuchungen zur Steigerung der Ethanolproduktionsrate durch Hefe bilden.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilera, A., 1986: Deletion of the phosphoglucose isomerase structural gene makes growth and sporulation glucose dependent in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Gen. Genet. **204**: 310-6
- Aguilera, A. und Zimmermann, F.K., 1986: Isolation and molecular analysis of the phosphoglucose isomerase structural gene of *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Gen. Genet. **202**: 83-9
- Arvanitidis, A. und Heinisch, J.J., 1994: Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by in vitro mutagenesis, J. Biol. Chem. **269**: 8911-8
- Avigad, G., 1981: Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose 2,6-bisphosphate, Biochem. Biophys. Res. Commun. **102**: 985-91
- Baker, H.V., 1991: *GCR1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **88**: 9443-7
- Barnett, J.A., 2003: Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research, Microbiology **149**: 557-67
- Behlke, J., Heidrich, K., Naumann, M., Müller, E.C., Otto, A., Reuter, R. und Kriegel, T., 1998: Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of oligomeric structure by in vivo phosphorylation at serine-14, Biochemistry **37**: 11989-95
- Benitez, T., Martinez, P. und Codon, A.C., 1996: Genetic constitution of industrial yeast, Microbiologia **12**: 371-84
- Bergmeyer, H.U., 1974: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim: 392-3
- Bisson, L.F., 1993: Yeast - metabolism of sugars, in: Wine Microbiology and Biotechnology, Fleet, G.H. (ed.), Harwood Academic Reading, Great Britain, **1**: 55-75
- Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G., 1983: Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **80**: 1730-4
- Boles, E., 1997: Pyruvate Kinase, in: Yeast Sugar Metabolism, Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (ed.), Technomic Publishing Company, Lancaster, **1**: 171-86
- Boles, E., Heinisch, J. und Zimmermann, F.K., 1993: Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast **9**: 761-70

- Boles, E. und Hollenberg, C.P., 1997: The molecular genetics of hexose transport in yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111
- Boles, E. und Zimmermann, F.K., 1993: *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase and fructose biphosphate aldolase can be replaced functionally by the corresponding enzymes of *Escherichia coli* and *Drosophila melanogaster*, *Curr. Genet.* **23**: 187-91
- Breitenbach-Schmitt, I., Heinisch, J., Schmitt, H.D. und Zimmermann, F.K., 1984: Yeast mutants without phosphofructokinase activity can still perform glycolysis and alcoholic fermentation, *Mol. Gen. Genet.* **195**: 530-5
- Brindle, P.K., Holland, J.P., Willett, C.E., Innis, M.A. und Holland, M.J., 1990: Multiple factors bind the upstream activation sites of the yeast enolase genes *ENO1* and *ENO2*: *ABFI* protein, like repressor activator protein *RAP1*, binds cis-acting sequences which modulate repression or activation of transcription, *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4872-85
- Burke, R.L., Tekamp-Olson, P. und Najarian, R., 1983: The isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **258**: 2193-201
- Cardinali, G. und Martini, A., 1994: Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 791-7
- Chambers, A., Tsang, J.S., Stanway, C., Kingsman, A.J. und Kingsman, S.M., 1989: Transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* *PGK* gene by *RAP1*, *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5516-24
- Chen, X.L., Reindle, A. und Johnson, E.S., 2005: Misregulation of 2 microm circle copy number in a SUMO pathway mutant, *Mol. Cell. Biol.* **25**: 4311-20
- Ciriacy, M., 1975: Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible *ADH II*, *Mol. Gen. Genet.* **138**: 157-64
- Ciriacy, M., 1979: Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (*ADHIII*) in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* **176**: 427-31
- Ciriacy, M., 1997: Alcohol Dehydrogenases, in: *Yeast Sugar Metabolism*, Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (ed.), Technomic Publishing Company, Lancaster, **1**: 213-24
- Ciriacy, M. und Breitenbach, I., 1979: Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **139**: 152-60
- Clifton, D., Weinstock, S.B. und Fraenkel, D.G., 1978: Glycolysis mutants in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **88**: 1-11

- Cohen, R., Yokoi, T., Holland, J.P., Pepper, A.E. und Holland, M.J., 1987: Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene *ENO1* is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences, *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2753-61
- Compagno, C., Ranzi, B.M. und Martegani, E., 1991: The promoter of *Saccharomyces cerevisiae* *FBA1* gene contains a single positive upstream regulatory element, *FEBS Lett.* **293**: 97-100
- Deminoff, S.J. und Santangelo, G.M., 2001: Rap1p requires Gcr1p and Gcr2p homodimers to activate ribosomal protein and glycolytic genes, respectively, *Genetics* **158**: 133-43
- Denis, C.L., Ferguson, J. und Young, E.T., 1983: mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source, *J. Biol. Chem.* **258**: 1165-71
- Dickinson, J.R., Salgado, L.E. und Hewlins, M.J., 2003: The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **278**: 8028-34
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Honer, C.B. und Hollenberg, C.P., 1991: An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera, *Yeast* **7**: 691-2
- Dombek, K.M., Camier, S. und Young, E.T., 1993: *ADH2* expression is repressed by *REG1* independently of mutations that alter the phosphorylation of the yeast transcription factor *ADR1*, *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4391-9
- Dombek, K.M. und Ingram, L.O., 1987: Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1286-91
- Drazinic, C.M., Smerage, J.B., Lopez, M.C. und Baker, H.V., 1996: Activation mechanism of the multifunctional transcription factor repressor-activator protein 1 (Rap1p), *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3187-96
- Drewke, C., Thielen, J. und Ciriacy, M., 1990: Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **172**: 3909-17
- Entian, K.D., Hilberg, F., Opitz, H. und Mecke, D., 1985: Cloning of hexokinase structural genes from *Saccharomyces cerevisiae* mutants with regulatory mutations responsible for glucose repression, *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3035-40
- Eraso, P. und Gancedo, J.M., 1984: Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP, *Eur. J. Biochem.* **141**: 195-8

- F.O. Licht, 2006: World ethanol production to approach 50 bln litres, *World Ethanol & Biofuels Report* **4**: 389
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F. und Käppeli, O., 1981: Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Adv. Microb. Physiol.* **22**: 123-83
- Fraenkel, D.G., 1982: Carbohydrate metabolism, in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, **1**: 1-37
- Fraenkel, D.G., 2003: The top genes: on the distance from transcript to function in yeast glycolysis, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 198-201
- Francois, J. und Parrou, J.L., 2001: Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 125-45
- Fredlund, E., Blank, L.M., Schnurer, J., Sauer, U. und Passoth, V., 2004: Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5905-11
- Gancedo, C. und Flores, C.L., 2004: The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi, *FEMS Yeast Res.* **4**: 351-9
- Gancedo, C. und Serrano, R., 1989: Energy-yielding metabolism, in: *The Yeasts*, Rose, A.H. and Harrison, J.S. (ed.), Academic Press, London, **1**: 205-59
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. und Schiestl, R.H., 1992: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* **20**: 1425
- Gietz, R.D. und Woods, R.A., 2002: Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Methods Enzymol.* **350**: 87-96
- Green, J.B., Wright, A.P., Cheung, W.Y., Lancashire, W.E. und Hartley, B.S., 1988: The structure and regulation of phosphoglucose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* **215**: 100-6
- Guthrie, C. und Fink, G.R., 1991: *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, in: *Methods in Enzymology*, Abelson, J.N. and Simon, M.I. (ed.), Academic -Press, Inc., New York, **194**:
- Haeckel, R., Hess, B., Lauterborn, W. und Wuster, K.H., 1968: Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**: 699-714
- Hanahan, D., 1985: Techniques for transformation of *E.coli*, in: *DNA Cloning*, Glocer, P.M. (ed.), IRL Press, Oxford, **1**: 109-35

- Hardy, C.F., Balderes, D. und Shore, D., 1992: Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein *RAP1* with effects on both transcriptional activation and silencing, *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1209-17
- Hauf, J., Zimmermann, F.K. und Müller, S., 2000: Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 688-98
- Heinisch, J., 1986a: Construction and physiological characterization of mutants disrupted in the phosphofructokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* **11**: 227-34
- Heinisch, J., 1986b: Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast, *Mol. Gen. Genet.* **202**: 75-82
- Heinisch, J. und Hollenberg, C.P., 1993: Yeasts - a review, in: *Biotechnology*, Rehm, H.J. and Reed, G. (ed.), VCH, Weinheim, **1**: 495-514
- Heinisch, J., Vogelsang, K. und Hollenberg, C.P., 1991: Transcriptional control of yeast phosphofructokinase gene expression, *FEBS Lett* **289**: 77-82
- Heinisch, J.J., 1993: *PFK2*, *ISP42*, *ERG2* and *RAD14* are located on the right arm of chromosome XIII, *Yeast* **9**: 1103-5
- Heinisch, J.J., Boles, E. und Timpel, C., 1996: A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-bisphosphate. Glycolysis/metabolic regulation/allosteric control, *J. Biol. Chem.* **271**: 15928-33
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P. und Jacoby, J.J., 1999: The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* **32**: 671-80
- Hess, B. und Boiteux, A., 1971: Oscillatory phenomena in biochemistry, *Annu. Rev. Biochem.* **40**: 237-58
- Hess, B. und Haeckel, R., 1967: Interaction between potassium-, ammonium- and fructose-1,6-diphosphate activation of yeast pyruvate kinase, *Nature* **214**: 848-9
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. und Tzagoloff, A., 1986: Yeast/ *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites, *Yeast* **2**: 163-7
- Hohmann, S., 1991: Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **173**: 7963-9
- Hohmann, S., 1997: Pyruvate Decarboxylases, in: *Yeast Sugar Metabolism*, Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (ed.), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, **1**: 187-212

- Hohmann, S., Winderickx, J., de Winde, J.H., Valckx, D., Cobbaert, P., Luyten, K., de Meirsmann, C., Ramos, J. und Thevelein, J.M., 1999: Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*, *Microbiology* **145** (Pt 3): 703-14
- Holland, M.J., T., Y., Holland, J.P., Myambo, K. und Innis, M.A., 1987: The *GCR1* gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **7**: 813-20
- Holland, M.J. und Westhead, E.W., 1973: Purification and characterization of aspartic beta-semialdehyde dehydrogenase from yeast and purification of an isozyme of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry* **12**: 2276-81
- Holzer, H., 1976: Catabolite inactivation in yeast, *TIBS* **1**: 178-81
- Huie, M.A., Scott, E.W., Drazinic, C.M., Lopez, M.C., Hornstra, I.K., Yang, T.P. und Baker, H.V., 1992: Characterization of the DNA-binding activity of *GCR1*: in vivo evidence for two *GCR1*-binding sites in the upstream activating sequence of *TPI* of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2690-700
- Huse, K., Jergil, B., Schwidop, W.D. und Kopperschläger, G., 1988: Evidence for phosphorylation of yeast phosphofructokinase, *FEBS Lett.* **234**: 185-8
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A., 1983: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* **153**: 163-8
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. und Wood, P.M., 2001: Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components, *Biochim. Biophys. Acta* **1504**: 179-95
- Kacser, H. und Burns, J.A., 1973: The control of flux, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**: 65-104
- Kacser, H., Burns, J.A. und Fell, D.A., 1995: The control of flux: 21 years on, *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 341-66
- Käppeli, O. und Sonnleitner, B., 1986: Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and conceptual considerations, *Critical Reviews in Biotechnology* **4**: 299-325
- Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H. und Klis, F.M., 2000: The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants, *Mol. Microbiol.* **35**: 601-11
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J., 1994: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 236-7

- Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. und Douglas, M.G., 1983: A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast, *Gene* **25**: 333-41
- Kopperschläger, G. und Heinisch, J., 1997: Phosphofruktokinase, in: *Yeast Sugar Metabolism*, Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (ed.), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, **1**: 97-118
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P. und Boles, E., 1998: Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis, *FEBS Lett.* **441**: 343-7
- Krogh, B.O. und Symington, L.S., 2004: Recombination proteins in yeast, *Annu. Rev. Genet.* **38**: 233-71
- Kuroda, S., Otaka, S. und Fujisawa, Y., 1994: Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements, *J. Biol. Chem.* **269**: 6153-62
- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. und Saez, M.J., 1982: Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems, *J. Bacteriol.* **152**: 19-25
- Lam, K.B. und Marmur, J., 1977: Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic pathway mutants, *J. Bacteriol.* **130**: 746-9
- Larsson, C., Pahlman, I.L. und Gustafsson, L., 2000: The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **16**: 797-809
- Liesen, T., Hollenberg, C.P. und Heinisch, J.J., 1996: ERA, a novel cis-acting element required for autoregulation and ethanol repression of *PDC1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* **21**: 621-32
- Lin, Y. und Tanaka, S., 2006: Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 627-42
- Lobo, Z., 1984: *Saccharomyces cerevisiae* aldolase mutants, *J. Bacteriol.* **160**: 222-6
- Lucero, P., Moreno, E. und Lagunas, R., 2002: Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source, *FEMS Yeast Res.* **1**: 307-14
- Ma, H., Bloom, L.M., Walsh, C.T. und Botstein, D., 1989: The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5643-9

- Maitra, P.K., 1970: A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. **245**: 2423-31
- Maitra, P.K. und Lobo, Z., 1971: A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast, J. Biol. Chem. **246**: 475-88
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J., 1982: Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 6.12, C.1
- Maraz, A., 2002: From yeast genetics to biotechnology, Acta Microbiol. Immunol. Hung. **49**: 483-91
- Mazon, M.J., Gancedo, J.M. und Gancedo, C., 1982: Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme, J. Biol. Chem. **257**: 1128-30
- McAllister, L. und Holland, M.J., 1985: Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes, J. Biol.Chem. **260**: 15019-27
- McNally, T., Purvis, I.J., Fothergill-Gilmore, L.A. und Brown, A.J., 1989: The yeast pyruvate kinase gene does not contain a string of non-preferred codons: revised nucleotide sequence, FEBS Lett. **247**: 312-6
- McNeil, J.B., Dykshoorn, P., Huy, J.N. und Small, S., 1990: The DNA-binding protein *RAP1* is required for efficient transcriptional activation of the yeast *PYK* glycolytic gene, Curr. Genet. **18**: 405-12
- Menezes, L.C. und Pudles, J., 1976: Studies on the active site of yeast hexokinase. Specific phosphorylation of a serine residue induced by D-xylose and ATPMg, Eur. J. Biochem. **65**: 41-7
- Moore, P.A., Bettany, A.J. und Brown, A.J., 1990a: Multiple copies of the pyruvate kinase gene affect yeast cell growth, J. Gen. Microbiol. **136**: 2359-66
- Moore, P.A., Bettany, A.J. und Brown, A.J., 1990b: The yeast pyruvate kinase gene is regulated at multiple levels, in: Post-transcriptional regulation of gene expression, McCarthy, J.E.G. and Tuite, M.F. (ed.), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1**: 421-32
- Moore, P.A., Bettany, A.J. und Brown, J.P., 1990c: Expression of a yeast glycolytic gene is subject to dosage limitation, Gene **89**: 85-92
- Morris, C.N., Ainsworth, S. und Kinderlerer, J., 1986: The regulatory properties of yeast pyruvate kinase. Effect of fructose 1,6-bisphosphate, Biochem. J. **234**: 691-8
- Morrow, B.E., Johnson, S.P. und Warner, J.R., 1989: Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer, J. Biol. Chem. **264**: 9061-8

- Muirhead, H., 1987: Pyruvate Kinase, in: Active Sites of Enzymes, Jornak, F.A. and McPherson, A. (ed.), John Wiley and Sons, Inc., London, New York, **3**: 144-86
- Müller, S., Boles, E., May, M. und Zimmermann, F.K., 1995: Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. **177**: 4517-9
- Muratsubaki, H. und Katsume, T., 1979: Distribution of hexokinase isoenzymes depending on a carbon source in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **86**: 1030-6
- Navas, M.A., Cerdan, S. und Gancedo, J.M., 1993: Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**: 1290-4
- Newcomb, L.L., Diderich, J.A., Slattery, M.G. und Heideman, W., 2003: Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes, Eukaryot. Cell **2**: 143-9
- Niederberger, P., Prasad, R., Miozzari, G. und Kacser, H., 1992: A strategy for increasing an *in vivo* flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast, Biochem. J. **287**: 473-9
- Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J. und Villadsen, J., 1997: Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, Microbiology **143**: 203-18
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S. und Paddon, C., 1997: Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast, Nucleic Acids Res. **25**: 451-2
- Packham, E.A., Graham, I.R. und Chambers, A., 1996: The multifunctional transcription factors Abf1p, Rap1p and Reb1p are required for full transcriptional activation of the chromosomal *PGK* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Gen. Genet. **250**: 348-56
- Palomino, A., Herrero, P. und Moreno, F., 2005: Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the *HXK2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. J. **388**: 697-703
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H. und Van Dijken, J.P., 1996: Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast **12**: 1607-33
- Reifenberger, E., 1995: Genetische und physiologische Untersuchungen zum Hexosetransport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Reifenberger, E., Freidel, K. und Ciriacy, M., 1995: Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux, Mol. Microbiol. **16**: 157-67

- Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D.H. und Lagunas, R., 1995: Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis, *J. Bacteriol.* **177**: 5622-7
- Rodicio, R., Heinisch, J.J. und Hollenberg, C.P., 1993: Transcriptional control of yeast phosphoglycerate mutase-encoding gene, *Gene* **125**: 125-33
- Rodicio, R., Schmitt, H.D., Heinisch, J. und Zimmermann, F.K., 1984: A hybrid DNA sequence containing the replication origin of the multicopy yeast plasmid 2 micron circle and an additional repeated sequence can convert maltose-negative into maltose-positive strains, *Mol. Gen. Genet.* **197**: 491-6
- Rodicio, R., Strauss, A. und Heinisch, J.J., 2000: Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP, *J. Biol. Chem.* **275**: 40952-60
- Rodriguez, 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**: 625-31
- Rose, M., Albig, W. und Entian, K.D., 1991: Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII, *European Journal of Biochemistry* **199**: 511-8
- Rosenzweig, R.F., 1992: Regulation of fitness in yeast overexpressing glycolytic enzymes: parameters of growth and viability, *Genet. Res.* **59**: 35-48
- Schaaff, I., Heinisch, J. und Zimmermann, F.K., 1989: Overproduction of glycolytic enzymes in yeast, *Yeast* **5**: 285-90
- Schehl, B., Müller, C., Senn, T. und Heinisch, J.J., 2004: A laboratory yeast strain suitable for spirit production, *Yeast* **21**: 1375-89
- Schlegel, H.G., 1992: *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 285-7
- Schmitt, H.D. und Zimmermann, F.K., 1982: Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis, *J. Bacteriol.* **151**: 1146-52
- Schork, S.M., Thumm, M. und Wolf, D.H., 1995: Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway, *J. Biol. Chem.* **270**: 26446-50
- Schröter, W., Lautenschläger, K.-H. und Bibrack, H., 1995: *Taschenbuch der Chemie*, Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt a.M.: 624
- Schüller, H.J., 2003: Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* **43**: 139-60

- Schwelberger, H.G., Kohlwein, S.D. und Paltauf, F., 1989: Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*, Eur. J. Biochem. **180**: 301-8
- Scott, E.W. und Baker, H.V., 1993: Concerted action of the transcriptional activators *REB1*, *RAP1*, and *GCR1* in the high-level expression of the glycolytic gene *TPI*, Mol. Cell. Biol. **13**: 543-50
- Seeboth, P.G., Bohnsack, K. und Hollenberg, C.P., 1990: *pdcl(0)* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural *PDC* gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*, J. Bacteriol. **172**: 678-85
- Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B., 1983: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 49-50
- Smith, M.G., Des Etages, S.G. und Snyder, M., 2004: Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway, Mol. Cell. Biol. **24**: 3874-84
- Smits, H.P., Hauf, J., Müller, S., Hobley, T.J., Zimmermann, F.K., Hahn-Hägerdal, B., Nielsen, J. und Olsson, L., 2000: Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast **16**: 1325-34
- Smogorzewska, A. und de Lange, T., 2002: Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells, Embo J. **21**: 4338-48
- Sols, A., 1981: Multimodulation of enzyme activity, Curr. Top. Cell. Regul. **19**: 77-101
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. und Davis, R.W., 1979: High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **76**: 1035-9
- Stryer, L., 1996: Biochemie, Spektrum, Akad. Verl., 522-3
- Teusink, B., Passarge, J., Reijenga, C.A., Esgalhado, E., van der Weijden, C.C., Schepper, M., Walsh, M.C., Bakker, B.M., van Dam, K., Westerhoff, H.V. und Snoep, J.L., 2000: Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry, Eur. J. Biochem. **267**: 5313-29
- Thevelein, J.M. und de Winde, J.H., 1999: Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Microbiol. **33**: 904-18
- Thomas, S. und Fell, D.A., 1998: A control analysis exploration of the role of ATP utilisation in glycolytic-flux control and glycolytic-metabolite-concentration regulation, Eur. J. Biochem. **258**: 956-67

- Uemura, H. und Fraenkel, D.G., 1990: *gcr2*, a new mutation affecting glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol. **10**: 6389-96
- Uemura, H. und Jigami, Y., 1992: *GCR3* encodes an acidic protein that is required for expression of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. **174**: 5526-32
- Uemura, H., Koshio, M., Inoue, Y., Lopez, M.C. und Baker, H.V., 1997: The role of Gcr1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics **147**: 521-32
- Valadi, H., Valadi, A., Ansell, R., Gustafsson, L., Adler, L., Norbeck, J. und Blomberg, A., 2004: NADH-reductive stress in *Saccharomyces cerevisiae* induces the expression of the minor isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*TDHI*), Curr. Genet. **45**: 90-5
- van der Aar, P.C., van den Heuvel, J.J., Roling, W.F., Raue, H.A., Stouthamer, A.H. und van Verseveld, H.W., 1992: Effects of phosphoglycerate kinase overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* on the physiology and plasmid stability, Yeast **8**: 47-55
- van Doorn, J., Valkenburg, J.A., Scholte, M.E., Oehlen, L.J., van Driel, R., Postma, P.W., Nanninga, N. und van Dam, K., 1988: Changes in activities of several enzymes involved in carbohydrate metabolism during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. **170**: 4808-15
- van Hoek, P., Flikweert, M.T., van der Aart, Q.J., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T., 1998: Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2133-40
- van Schaftingen, E. und Hers, H.G., 1981: Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **78**: 2861-3
- van Schaftingen, E., Hue, L. und Hers, H.G., 1980: Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase, Biochem. J. **192**: 897-901
- Versele, M., de Winde, J.H. und Thevelein, J.M., 1999: A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2, Embo J. **18**: 5577-91
- Vieira, J. und Messing, J., 1991: New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins, Gene **100**: 189-94
- Walker, G.M., 1998: Yeast - Physiology and Biotechnology, John Wiley and Sons, West Sussex, Great Britain: 265-311

- Wang, K.L. und Warner, J.R., 1998: Positive and negative autoregulation of *REB1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4368-76
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E., 1999: Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **464**: 123-8
- Willis, K.A., Barbara, K.E., Menon, B.B., Moffat, J., Andrews, B. und Santangelo, G.M., 2003: The global transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*, Gcr1p, mediates the response to glucose by stimulating protein synthesis and *CLN*-dependent cell cycle progression, *Genetics* **165**: 1017-29
- Yagi, S., Yagi, K., Fukuoka, J. und Suzuki, M., 1994: The UAS of the yeast GAPDH promoter consists of multiple general functional elements including *RAP1* and *GRF2* binding sites, *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 235-44
- Yarragudi, A., Miyake, T., Li, R. und Morse, R.H., 2004: Comparison of *ABF1* and *RAP1* in chromatin opening and transactivator potentiation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **24**: 9152-64
- Young, E.T. und Pilgrim, D., 1985: Isolation and DNA sequence of *ADH3*, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3024-34
- Yu, Q., Qiu, R., Foland, T.B., Griesen, D., Galloway, C.S., Chiu, Y.H., Sandmeier, J., Broach, J.R. und Bi, X., 2003: Rap1p and other transcriptional regulators can function in defining distinct domains of gene expression, *Nucleic Acids Res.* **31**: 1224-33
- Yuan, Z., Medina, M.A., Boiteux, A., Müller, S.C. und Hess, B., 1990: The role of fructose 2,6-bisphosphate in glycolytic oscillations in extracts and cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* **192**: 791-5
- Zagulski, M., Herbert, C.J. und Rytka, J., 1998: Sequencing and functional analysis of the yeast genome, *Acta Biochim. Pol.* **45**: 627-43
- Zamenhoff, S., 1957: Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue, *Methods Enzymol.* **3**: 696-704

7 Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
PCR	Poymerase Chain Reaction
kbp	Kilobasenpaare
bp	Basenpaare
PEP	Phosphoenolpyruvat
UAS	upstream activating sequence
URS	upstream repressing sequence
MCA	Metabolic Control Analysis
MFA	Metabolic Flux Analysis

Anhang I – Sequenzierung von *TDH2*

Sequenzierung von pMHE11 (*TDH2*) mit den Oligonukleotiden M13F (MES3), M13R (MES4), THD2prom (MES5) und THD2rev (MES6)(vgl. Tab. 1.1.1) im Vergleich zur Sequenz von *TDH2* aus der Saccharomyces genome database (www.sgd.com). Die Basenpaarnummern beziehen sich auf die mit * gekennzeichneten Basen. Das Startcodon ATG für *TDH2* liegt bei Basenpaarnummer 5001 (**atg**) und das Stopcodon TAA bei Basenpaarnummer 5997 (**taa**). Für *TDH2* in pMHE11 wurden keine Austausche gefunden (vgl. Abschnitt 3.1.2.1).

		4210	4220	4230	4240	4250	4260
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		tctaaataacttctgtgttttcattaatttataaattgtactcttttaagacatggaaagtaccaacatcg					
MES3 .ab1		tctaaataacttctgtgttttcattaatttataaattgtactcttttaagacatggaaagtaccaacatcg					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					
		4280	4290	4300	4310	4320	4330
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		gttgaaacagtttttcatttacttatggtttattggttttccagtgaaatgattatttgcggtaccctt					
MES3 .ab1		gttgaaacagtttttcatttacttatggtttattggttttccagtgaaatgattatttgcggtaccctt					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					
		4350	4360	4370	4380	4390	4400
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		tcgtaaaagttcaaacacgtttttaagtattgtttagttgctctttcgacatatatgattatccctgcgc					
MES3 .ab1		tcgtaaaagttcaaacacgtttttaagtattgtttagttgctctttcgacatatatgattatccctgcgc					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					
		4420	4430	4440	4450	4460	4470
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		ggctaaagttaaggatgcaaaaaacataagacaactgaagttaatttacgtcaattaagttttccagggg					
MES3 .ab1		ggctaaagttaaggatgcaaaaaacataagacaactgaagttaatttacgtcaattaagttttccagggg					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					
		4490	4500	4510	4520	4530	4540
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		aatgatgttttgggcttccactaattcaataagtatgtcatgaaatacgttgtgaagagcatccagaaat					
MES3 .ab1		aatgatgttttgggcttccactaattcaataagtatgtcatgaaatacgttgtgaagagcatccagaaat					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					
		4560	4570	4580	4590	4600	4610
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>		aatgaaaagaacaacgaaactgggtcggcctgttgtttcttttaccacgtgatctgcggcattta					
MES3 .ab1		aatgaaaagaacaacgaaactgggtcggcctgttgtttcttttaccacgtgatctgcggcattta					
MES5 .ab1		-----					
MES6 .ab1		-----					
MES4 .ab1		-----					

```

*           4630           4640           4650           4660           4670           4680
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      caggaagtcgcgcggttttgcgcgagttggtgcaacgcagctacggctaacaaagcctagtgggaactcgact
MES3.ab1  caggaagtcgcgcggttttgcgcgagttggtgcaacgcagctacggctaacaaagcctagtgggaactcgact
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  -----

*           4700           4710           4720           4730           4740           4750
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      gatgtggttagggcctaaaactggtggtgacagctgaagtgaactattcaatccaatcatgtcatggctgt
MES3.ab1  gatgtggttagggcct-aaaactggtggtgacagctg-agtgaactattcaatccaatcatgtcatggctgt
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  -----

*           4770           4780           4790           4800           4810           4820
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      cacaaagacctgCGGaccgcacgtacgaacacatacgtatgctaataatggtgtttgatagtagtaccagtg
MES3.ab1  cacaaagacctgCGGaccgcacgtacgaacacatacgtatgctaataatgkg-tttgatagtagtaccagtg
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  -----

*           4840           4850           4860           4870           4880           4890
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      atcgagacctgcaattttttgtagggttggagaatatataaagggttgactcattcaagatagtttt
MES3.ab1  atcgagacctgccatttttttg-----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  -----

*           4910           4920           4930           4940           4950           4960
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      tt-tcttgtgtgctattcat----tttattattggttgtttaaagttaaaaaaaccaagaacttagtt
MES3.ab1  tt-tcttgtgtgctattcataataaytattattggttgtttaaagttaaaaaaaccaagaacttagtt
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  -----

*           4970           4980           4990           5000           5010           5020           5030
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      tcaaattaaattcatcacacaaacaaacaaacaaatggttagagttgctattaacggtttcggtagaa
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  tcaaattaaattcatcacacaaacaaacaaacaaatggttagagttgctattaacggtttcggtagaa
MES6.ab1  tcaa--taa--tcat--cmccaaccagcaaacc--aatgg-tagaggtgctat--acg--ttcggtagaa
MES4.ab1  -----

*           5040           5050           5060           5070           5080           5090           5100
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      tcggtagattggttatgagaattgctttgcaaagaagaacgctcgaagttggtgctttgaacgatccttt
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  tcggtagattggttatgagaattgctttgcaaagaagaacgctcgaagttggtgctttgaacgatccttt
MES6.ab1  tc-gtagattggttatgagaa-tgc-ttgc-aagaagaacgctcgaagttggtgctttgaacgatccttt
MES4.ab1  -----

*           5110           5120           5130           5140           5150           5160           5170
*           *           *           *           *           *           *
TDH2      catctctaacgactactccgcttacatggttaagtaacgactctactcacggtagatagcgtggggaagtt
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  catctctaacgactactccgcttacatggttaagtaacgactctactcacggtagatagcgtggggaagtt
MES6.ab1  catctctaacgactactccgcttacatggttaagtaacgactctactcacggtagatagcgtggggaagtt
MES4.ab1  -----

```

	5180	5190	5200	5210	5220	5230	5240
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	tcccacgatgacaagcacatcatcgttgatggtcacaagatcgccactttccaagaaagagaccagcta						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	tcccacgatgacaagcacatcatcgttgatggtcacaagatcgccactttccaagaaagagaccagcta						
MES6.ab1	tcccacgatgacaagcacatcatcgttgatggtcacaagatcgccactttccaagaaagagaccagcta						
MES4.ab1	-----						
	5250	5260	5270	5280	5290	5300	5310
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	acttgccatgggcttctcctaacattgacatcgccattgactccactgggtgtttccaaggaattggacac						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	acttgccatgggcttctcctaacattgacatcgccattgactccactgggtgtttccaaggaattggacac						
MES6.ab1	acttgccatgggcttctcctaacattgacatcgccattgactccactgggtgtttccaaggaattggacac						
MES4.ab1	-----						
	5320	5330	5340	5350	5360	5370	5380
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	tgctcaaaagcacattgacgctggtgccaagaaggttgatcatcactgctccatcttccaccgccccaatg						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	tgctcaaaagcacattgacgctggtgccaagaaggttgatcatcactgctccatcttccaccgccccaatg						
MES6.ab1	tgctcaaaagcacattgacgctggtgccaagaaggttgatcatcactgctccatcttccaccgccccaatg						
MES4.ab1	-----						
	5390	5400	5410	5420	5430	5440	5450
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	ttcgtcatgggtgttaacgaagaaaaatacacttctgacttgaagattgtttccaacgcttcttgtacca						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	ttcgtcatgggtgttaacgaagaaaaatacacttctgacttgaagattgtttccaacgcttcttgtacca						
MES6.ab1	ttcgtcatgggtgttaacgaagaaaaatacacttctgacttgaagattgtttccaacgcttcttgtacca						
MES4.ab1	-----gtt-acg-aga-----atactt-c-gact--gagatggt---caacgctcct--gaccm						
	5460	5470	5480	5490	5500	5510	5520
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	ccaactgtttggctccattggccaagggttatcaacgatgctttcggtattgaagaaggtttgatgaccac						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	ccaactgtttggctccattggccaagggttatcaacgatgctttcggtattgaagaaggtttgatgaccac						
MES6.ab1	ccaactgtttggctccattggccaagggttatcaacgatgctttcggtattgaagaaggtttgatgaccac						
MES4.ab1	ccaacygtt--ggtccattg--ca--gtttcaacggatgctt--cgtattg--agaagg--ttgatgaaccm						
	5530	5540	5550	5560	5570	5580	5590
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	tgttcactccatgaccgccacccttcaaaagactggtgacgggtccatcccacaaggactggagaggtggtaga						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	tgttcactccatgaccgccacccttcaaaagactggtgac--gtccat--ccac--aggactggagaggtggtaga						
MES6.ab1	tgttcactccatgaccgccacccttcaaaagactggtgacgggtccatcccacaaggactggagaggtggtaga						
MES4.ab1	tgttcaccctccatgaccgccacccttcaaaagactggtgacgggtccat--ccacaa--gactggaraggtggtaga						
	5600	5610	5620	5630	5640	5650	5660
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	accgcttccggtaacatcatcccacctctaccgggtgctgctaaggctgctcggttaaggctcttgccagaat						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	accgct--cg--tacatcat--ccatcctctacc--gtgctgctaa--gctg--cgta--gtcttg--cagaat						
MES6.ab1	accgcttccggtaacatcatcccacctctaccgggtgctgctaaggctgctcggttaaggctcttgccagaat						
MES4.ab1	accgcttccggtaacatcattcccacctctaccgggtgctgctaaggctgctcggttaaggctcttgccagaat						
	5670	5680	5690	5700	5710	5720	5730
	*	*	*	*	*	*	*
<i>TDH2</i>	tgcaaggtaagttgaccggatggtcttccagagtccaaccgctcgatgtttccggtggtgacttgactgt						
MES3.ab1	-----						
MES5.ab1	tgca--gt--agttgac---gatg--cttca--agtcc-----						
MES6.ab1	tgcaaggtaagttgaccggatggtcttccagagtccaaccgctcgatgtttccggtggtgacttgactgt						
MES4.ab1	tgcaaggtaagttgaccggatggtcttccagagtccaaccgctcgatgtttccggtggtgacttgactgt						

```

      5740      5750      5760      5770      5780      5790      5800
      *        *        *        *        *        *        *
TDH2      caagttgaacaaggaaaccacctacgatgaaatcaagaaggttgtcaaggctgccgctgaaggtaagtgtg
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  caagttgaacaaggaaaccacckwcatgaaatcaagaaggktgtcaa-----
MES4.ab1  caagttgaacaaggaaaccacctacgatgaaatcaagaaggttgtcaaggctgccgctgaaggtaagtgtg

      5810      5820      5830      5840      5850      5860      5870
      *        *        *        *        *        *        *
TDH2      aaggggtgtcctgggttacactgaagacgctggtgtctcctctgacttcttgggtgactctaactcttcca
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  aaggggtgtcctgggttacactgaagacgctggtgtctcctctgacttcttgggtgactctaactcttcca

      5880      5890      5900      5910      5920      5930      5940
      *        *        *        *        *        *        *
TDH2      tcttcgatgctgccgctgggatccaattgtctccaaagttcgtcaagttggtttctggtacgacaacga
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  tcttcgatgctgccgctgggatccaattgtctccaaagttcgtcaagttggtttctggtacgacaacga

      5950      5960      5970      5980      5990      6000      6010
      *        *        *        *        *        *        *
TDH2      atacggttactctaccagagttgtcgacttgggtgaacacgcttgccaaggcttaaatttaactccttaag
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  atacggttactctaccagagttgtcgacttgggtgaacacgcttgccaaggcttaaatttaactccttaag

      6020      6030      6040      6050      6060      6070      6080
      *        *        *        *        *        *        *
TDH2      ttactttaatgatttagtttttattattaataattcatgctcatgacatctcatatacacgtttataaaa
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  ttactttaatgatttagtttttattattaataattcatgctcatgacatctcatatacacgtttataaaa

      6090      6100
      *        *
TDH2      cttaaatagattgaaa
MES3.ab1  -----
MES5.ab1  -----
MES6.ab1  -----
MES4.ab1  cttaaatagattgaaa

```

Anhang II – Sequenzierung von *HXT1*

Sequenzierung von pMHE30 (*HXT1*) mit den Oligonukleotiden HXTseq1 (MES10), HXTseq2 (MES11), HXTseq3 (MES12), HXTseq4 (MES13)(vgl. Tab. 1.1.1) im Vergleich zur Sequenz von *HXT1* aus der Saccharomyces genome database (www.sgd.com). Die Basenpaarnummern beziehen sich auf die mit * gekennzeichneten Basen. Das Startcodon ATG für *HXT1* liegt bei Basenpaarnummer 5001 (**atg**) und das Stopcodon TAA bei Basenpaarnummer 6711 (**taa**). Für *HXT1* in pMHE30 ermittelte Basenaustausche sind grau (**a**) hervorgehoben. Der Basenaustausch, der zur Veränderung der Aminosäuresequenz führt, liegt bei Basenpaarnummer 6135 (t→c) (vgl. Abschnitt 3.1.2.2).

```

          4960      4970      4980      4990      5000      5010
*          *          *          *          *          *
HXT1      taaaatctataaaagatatcataatcgtcaactagttgatatacgtaaaatcatgaattcaactcccgatc
MES10.ab1 -----atcataatcgtcaactaggtgatatacgtaaaatcatgaattcaactcccgatc
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5030      5040      5050      5060      5070      5080
*          *          *          *          *          *
HXT1      taatatctcctcagaaatccaattcatccaactcatatgaattggaatctggtcggtcaaaggccatgaa
MES10.ab1 taatatctcctcagaaatccaattcatccaactcatatgaattggaatctggtcggtcaaaggccatgaa
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5100      5110      5120      5130      5140      5150
*          *          *          *          *          *
HXT1      tactccagaaggtaaaaatgaaagttttcaccgacaacttaagtgaaagtcaagtgcaaccgcgcttgcc
MES10.ab1 tactccagaaggtaaaaatgaaagttttcaccgacaacttaagtgaaagtcaagtgcaaccgcgcttgcc
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5170      5180      5190      5200      5210      5220
*          *          *          *          *          *
HXT1      cctccaaacaccggaaaagggtgtctacgtaacggtttctatctgttgtggtatggttgctttcggtggtt
MES10.ab1 cctccaaacaccggaaaagggtgtctacgtaacggtttctatctgttgtggtatggttgctttcggtggtt
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5240      5250      5260      5270      5280      5290
*          *          *          *          *          *
HXT1      tcatatttggatgggatactggtaccatcttctggttttggttgctcaaactgattttctaagaagatttgg
MES10.ab1 tcatatttggatgggatactggtaccatcttctggttttggttgctcaaactgattttctaagaagatttgg
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5310      5320      5330      5340      5350      5360
*          *          *          *          *          *
HXT1      tatgaagcaccacgacggtagtcattacttgtccaagggtgagaactggtttaattgtctctatttttaac
MES10.ab1 tatgaagcaccacgacggtagtcattacttgtccaagggtgagaactggtttaattgtctctatttttaac
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

```



```

          5380      5390      5400      5410      5420      5430
      *          *          *          *          *          *
HXT1    attggttggtgccattggtggatcgtcttagccaagctaggtgatatgatggctgtagaatcggtttga
MES10.ab1 attggttggtgccattggtggatcgtcttagccaagctrggtgatatgatggctgtagaatcggtttga
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5450      5460      5470      5480      5490      5500
      *          *          *          *          *          *
HXT1    ttgctggttagtaaatctacactatcggtatcattattcaaatagcctcgatcaacaagtggtagcaata
MES10.ab1 ttgctggttagtaaatctacactatcggtatcattattcaaatagcctcgatcaacaagtggtagcaata
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5520      5530      5540      5550      5560      5570
      *          *          *          *          *          *
HXT1    tttcattggtagaattatc-tctggttaggtgctgggtggatcacagttttatctcccatgctaatac
MES10.ab1 tttcattggtagaattatc-wactggttaggtgctgggtggatcacagttttatct-----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5580      5590      5600      5610      5620      5630      5640
      *          *          *          *          *          *          *
HXT1    tgaggctgccccagtgaaatgagaggcaccttggtttcatggttaccagtcattgattacttttaggtatt
MES10.ab1 tgaggctgccccagtgaaatgagaggcaccttggtttcatggttaccagtcattgattacttttaggtatt
MES11.ab1 tgaggctgccccagtgaaatgagaggcaccttggtttcatggttaccagtcattgattacttttaggtatt
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5650      5660      5670      5680      5690      5700      5710
      *          *          *          *          *          *          *
HXT1    ttcttaggttactgtaccaattttggtaccaagaataactcaaacctctgtccaatggagagttccattag
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 ttcttaggttactgtaccaattttggtaccaagaataactcaaacctctgtccaatggagagttccattag
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5720      5730      5740      5750      5760      5770      5780
      *          *          *          *          *          *          *
HXT1    gtttgggtttcgcctgggccttatttatgattggtggatgatggtttggtcctgaatctccacgttattt
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 gtttgggtttcgcctgggccttatttatgattggtggatgatggtttggtcctgaatctccacgttattt
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5790      5800      5810      5820      5830      5840      5850
      *          *          *          *          *          *          *
HXT1    ggttgaagctggcagaatcgacgaagccagggcttcttttagctaaagttaacaaatgccacctgacat
MES10.ab1 ggttgaagctggcagaatcgacgaagccagggcttcttttagctaaagttaacaaatgccacctgacat
MES11.ab1 ggttgaagctggcagaatcgacgaagccagggcttcttttagctaaagttaacaaatgccacctgacat
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

          5860      5870      5880      5890      5900      5910      5920
      *          *          *          *          *          *          *
HXT1    ccatacattcaatatgagttggaaactatcgaagccagtgctgaagaaatgagagccgctggtagtgc
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 ccatacattcaatatgagttggaaactatcgaagccagtgctgaagaaatgagagccgctggtagtgc
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

```

```

5930      5940      5950      5960      5970      5980      5990
*         *         *         *         *         *         *
HXT1     ctggggcgaattattcactggtaaaccagccatgtttcaacgtactatgatgggtatcatgattcaatc
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 ctggggcgaattattcactggtaaaccagccatgtttcaacgtactatgatgggtatcatgattcaatc
MES13.ab1 -----
MES12.ab1 -----

6000      6010      6020      6030      6040      6050      6060
*         *         *         *         *         *         *
HXT1     tctacaacaattaactggtgataactatcttctactacgggtaccattgttttccaggctgtcggttt-
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 tctacaacaattaactggtgataactatcttctactacgggtaccattgttttccaggctgtcggttt-
MES13.ab1 -----taccggtacmcatkgtttccaggctgtcggttta
MES12.ab1 -----

6070      6080      6090      6100      6110      6120      6130
*         *         *         *         *         *         *
HXT1     aagtgactcttttgaaacttctattg-tctt-tgggtgctgt-caacttcttctcc-acttggtg--tct
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 aagtgactcttttgaaacttctattg-tctt-tgggtgctgt-caacttcttctcc-acttggtg--ctct
MES13.ab1 aagtgaccttttgaaacttctattgttcttagggkgtcgtccaacttcttctccaacttggtggcyyct
MES12.ab1 -----actctyttgaaatttctattg-tcttctgggtgctgt-caacttcttctcc-acttggtg--ctct

6140      6150      6160      6170      6180      6190
*         *         *         *         *         *
HXT1     ctg-tacaccggt-gaccgttttg-gccgctgtaactgtttgatgtgggggtg-ctgtc-ggtat-ggt-c
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 ctg-cacaccggt-gaccgttttgaccgctgtaactgtttgatgtgggggtg-ctgtc-ggtat-ggtmc
MES13.ab1 ctgcmacaacggttkgaccgttttg-gccgctgtaactgtttgatktgggggtgactgtcgggtatgggt-c
MES12.ab1 ctg-cacaccggt-gaccgttttg-gccgctgtaactgtttgatgtgggggtg-ctgtc-ggtat-ggt-c

6200      6210      6220      6230      6240      6250      6260
*         *         *         *         *         *         *
HXT1     tgctggttatgtgtctatgcctctggt-ggtgttaccagattatgg--ccaaacggtc-aagatcaacca
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 tgctgctatgtgtctatgcctctggt--gtgttaccagattatgg--ccaaacggtc-aagatcaacca
MES13.ab1 tgctgggtatgtgtctatgcctctggttkgggtgttaccagattatggggccaaacggtcaaagatcaacca
MES12.ab1 tgctggttatgtgtctatgcctctggt-ggtgttaccagattatgg--ccaaacggtc-aagatcaacca

6270      6280      6290      6300      6310      6320
*         *         *         *         *         *
HXT1     tcttcaaaggggtgctggt-aactgtatgattgttttcgcatgttt-ctaca--ttttctgtttcgc-tac
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 tcttcaa--ggtgctgggtcaactgcatgattg-ttctgcatgtttactacatTTTTTctgtttcgcttac
MES13.ab1 tcttcaaaggggtgctggt-aactgtatgattgttttcgcatgttt-ctaca--ttttctgtttcgc-tac
MES12.ab1 tcttcaaaggggtgctggt-aactgtatgattgttttcgcatgttt-ctaca--ttttctgtttcgc-tac

6330      6340      6350      6360      6370      6380
*         *         *         *         *         *
HXT1     tacctgggcccccaattgctt-acggt-gttatttcagaatgtttcccatTAAGAG---tcaaATCCA-ag
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 tacctgg--ccaatagcttcacgttggtttatgcagaatggttgccatmaagrgatcccaaATCCAGCG
MES13.ab1 tacctgggcccccaattgctt-acggt-gttatttcagaatgtttcccatTAAGAG---tcaaATCCA-ag
MES12.ab1 tacctgggcccccaattgctt-acggt-gttatttcagaatgtttcccatTAAGAG---tcaaATCCA-ag

6400      6410      6420      6430      6440      6450
*         *         *         *         *         *
HXT1     tgtatgtctattgccagtgtgctaactggatctgggggtttcttgattagtttcttcaCCCCATTTATTA
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 tgt-----
MES13.ab1 tgtatgtctattgccagtgtgctaactggatctgggggtttcttgattagtttcttcaCCCCATTTATTA
MES12.ab1 tgtatgtctattgccagtgtgctaactggatctgggggtttcttgattagtttcttcaCCCCATTTATTA

```

```

          6470      6480      6490      6500      6510      6520
          *        *        *        *        *        *
HXT1      ctggtgccatcaacttctactacggttacgtttcatgggctgtatggtttctgcttacttttacgtctt
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 ctggtgccatcaacttctactacggttacgtttcatgggctgtatggtttctgcttacttttacgtctt
MES12.ab1 ctggtgccatcaacttctactacggttacgtttcatgggctgtatggtttctgcttacttttacgtctt

          6540      6550      6560      6570      6580      6590
          *        *        *        *        *        *
HXT1      tttcttcggttcagaaactaaaggtttatcattagaagaagttaatgatatgtacgccgaagggttcta
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 tttcttcggttcagaaactaaaggtttatcattagaagaagttaatgatatgtacgccgaagggttcta
MES12.ab1 tttcttcggttcagaaactaaaggtttatcattagaagaagttaatgatatgtacgccgaagggttcta

          6610      6620      6630      6640      6650      6660
          *        *        *        *        *        *
HXT1      ccatggaaatcagcttcctgggttccagtatccaagagaggcgctgactacaacgctgatgacctaatgc
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 ccatggaaatcagcttcctgggttccagtatccaagagaggcgctgactacaacgctgatgacctaatgc
MES12.ab1 ccatggaaatcagcttcctgggttccagtatccaagagaggcgctgactacaacgctgatgacctaatgc

          6680      6690      6700      6710      6720      6730
          *        *        *        *        *        *
HXT1      atgatgacc-aaccattttacaagagtttgttttagcaggaaataaactaacaagctcaatatgcatatt
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 atgatgacc-aaccattttacaagagtttgttttagcaggaaataaactaacaagctcaatatgcatatt
MES12.ab1 atgatgaccmaccattttacaagag-----

          6740      6750      6760      6770      6780      6790      6800
          *        *        *        *        *        *
HXT1      ttaatgacttatacagtatattaatttctcagtaaattttataaagggtgatattatattgggtgttaaaaca
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 ttaatgacttatacagkatattaatttctcagtaaawwwataaagggtgatattatattgggtgttaaaacg
MES12.ab1 -----

          6810      6820      6830      6840      6850      6860      6870
          *        *        *        *        *        *
HXT1      aaattcttgtcaaattcataa-acagatggtccttttcttctgtagttcttgacctcaccaaggaacaag
MES10.ab1 -----
MES11.ab1 -----
MES13.ab1 agattcwygyccacaatcataagacagatgt-----
MES12.ab1 -----

          6880
          *
HXT1      aaa
MES10.ab1 ---
MES11.ab1 ---
MES13.ab1 ---
MES12.ab1 ---

```

Anhang III – Sequenzierung von *PFK1_{atp}*

Sequenzierung von pMHE41 (*PFK1_{atp}*) mit dem Oligonukleotid M13R (vgl. Tab. 1.1.1) (MES8) im Vergleich zur Sequenz von *PFK1* aus der Saccharomyces genome database (www.sgd.com). Die Basenpaarnummern beziehen sich auf die mit * gekennzeichneten Basen. Relevante Basenaustausche sind grau hervorgehoben **a**. Der die ATP-Insensitivität bewirkende Basenaustausch (c→t) liegt bei Base Nr. 7183. Zwei weitere Basenaustausche, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz der Phosphofruktokinase bewirken, liegen bei Base 7371 (g→a) und 7473 (a→g) vor (vgl. Abschnitt 3.1.2.3).

		7110	7120	7130	7140	7150	7160
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		gcaattgCGTgacggtagaacccaacccaatctttaacattccaatgtggtttgattccagccactggt					
MES8.ab1		gcaattgCGTgacggtagaacccaacccaatctttaacattccaatgtggtttgattccagccactggt					
		7180	7190	7200	7210	7220	7230
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		tctaacaacggttc ag gtactgaataactcacttgggtgttgatacctgtttgaacgcattagtcaattaca					
MES8.ab1		tctaataacggttc ag gtaccgaataactcacttgggtgttgatacctgtttgaacgcattagtcaattaca					
		7250	7260	7270	7280	7290	7300
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		ctgatgacatcaaacagagtgcttctgCGaacaagaagaagagtcttcgctctgtgaagtccaaggtggtca					
MES8.ab1		ctgatgacatcaacaaagtgcttctgCCaacaagaagaagagtcttcgctctgtgaagtccaaggtggtca					
		7320	7330	7340	7350	7360	7370
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		ctctggttacatcgcttctttt ca ctgggtttaaactcactgggtgctgtttcagtgtagactccag aaa agaag					
MES8.ab1		ctctggttacatcgcttctttt ca ccgggtttaaactcactgggtgctgtttccggtgtagactccag aaa agaag					
		7390	7400	7410	7420	7430	7440
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		atcgacttagcttctatcagagaagatataaactctattaaaagagaactttcgtcagcacaaggtgaaa					
MES8.ab1		atcgacttagcttctatcagagaagatataaactctattaaaagagaactttcgtcagcacaaggtgaaa					
		7460	7470	7480	7490	7500	7510
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		acagaaacggtaagctattggtt ag aaacgaacaagcttctagcgtatatagcactcaattggtggctga					
MES8.ab1		acagaaacggtaagctattggtt ag aaacgaacaagcttctagcgtatatagcactcaattggtggctga					
		7530	7540	7550	7560	7570	7580
	*	*	*	*	*	*	*
<i>PFK1</i>		catcatctctgaagcaagcaaggtaagtttgggtgttagaactgctatcccaggccatggttcaacaaggt					
MES8.ab1		catcatctctg-----					
		7600					
	*	*					
<i>PFK1</i>		ggtgttccatc					
MES8.ab1		-----					

Lebenslauf

Name	Markus Emili
Wohnort	Keplerstraße 18, 72810 Gomaringen
Geburt	31.10.1972 in Münsingen
Nationalität	deutsch
1979-1983	Schloßschule, Gomaringen
1983-1992	Quenstedt-Gymnasium, Mössingen
1992	Abitur
1992-1993	Zivildienst, Freiburg i. Brsg.
1993-1994	Studium der Mineralogie, Universität Tübingen
1994-2001	Studium der Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim
1997-1998	Auslandsstudium, Norges Landbrukshøgskole (NLH), Ås
2001	Diplom- Lebensmittelingenieur
2001-2006	Dissertation an der Universität Hohenheim

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe (§9 Abs. 2 Ziffer 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat. vom 04.05.1993)

Hohenheim, im Juni 2006

(Markus Emili)

Mein Herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Jürgen Heinisch für die Überlassung des Themas, die geduldige und lehrreiche Einführung in die Hefegenetik, die inspirierenden Diskussionen und die ansteckende Begeisterung für Hefen

Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Senn für die anregenden Diskussionen sowie die lehrreichen und schönen Jahre am Fachgebiet Gärungstechnologie

Frau Daniela Palgunow für die Konstruktion von pMHE22

Allen Hohenheimer Kollegen für das angenehme Miteinander: Dagmar Hahn, Ottfried Jung, Klaus Dittmann, Dr. Jens Glatthar, Dr. Beatus Schehl, Sven Fleischer, Chritsine Müller, Oliver Reber, Martin Trautner, Achim Lindel, Benjamin Krumm, Bernhard Fischer, Karin Kohler, Bärbel Schlecht

Allen Osnabrücker Kollegen für eine schöne Zeit, wertvolle Diskussionen und zahlreiche Hilfestellungen: PD Dr. Knut Jahreis, Dr. Kurt Schmid, Prof. Dr. Rosaura Rodicio, Dr. Hans-Peter Schmitz, Diana Augustin, Andrea Murra, Ariane Staab, Andrea Straede, Sabrina Koch, Ivan Ciklic, Nadine Albert, Angelika Kroll, Lucille Schmieding und den Bätschis Daniela Palgunow, Karina Buck, Yvonne Döring

Mein inniger Dank gilt Trine für die Geduld, das Vertrauen und die Zuversicht, Knödel für die gewaltige seelische und computertechnische Unterstützung sowie meinen Eltern für das Verständnis, die Geduld und die Teilfinanzierung des Projektes.