

Untersuchungen zur Wahrnehmung und zur Aufnahme von Riboflavin in *Saccharomyces cerevisiae*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Petra Reihl
aus Thiersheim

2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 26. Juni 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. J. Stolz

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. R. Warth

1. Prüfer: PD Dr. J. Stolz

2. Prüfer: Prof. Dr. W. Seufert

3. Prüfer: Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Riboflavin	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Industrielle Synthese von Riboflavin.....	3
1.1.3 Biosynthese von Riboflavin, FMN und FAD.....	5
1.1.4 Physiologische Bedeutung von FMN und FAD.....	8
1.2 Vitamintransport	11
1.2.1 Vitamintransportproteine in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	12
1.2.2 Riboflavintransport	16
1.3 Wahrnehmung von Substraten in <i>S. cerevisiae</i> und Regulation der Transportproteine.	19
1.3.1 Wahrnehmung von Glucose	19
1.3.2 Wahrnehmung von Phosphat	23
1.3.3 Wahrnehmung von Thiamin.....	25
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Material	28
2.1.1 Organismen	28
2.1.2 Plasmide.....	30
2.1.3 Oligonukleotide.....	33
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen	35
2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial.....	39
2.1.6 Geräte.....	40
2.1.7 Internetdienste	40
2.1.8 Software	40
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Allgemeine Wachstumsmethoden.....	41
2.2.1.1 Anzuchtbedingungen und Anlegen von Dauerkulturen	41
2.2.1.2 Durchführung von Wachstumstests	41
2.2.1.3 Sporulation von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.1.4 Tetraden Dissektion	41
2.2.1.5 Isolation von rib*-Mutanten	42
2.2.2 Allgemeine genetische Methoden	42
2.2.2.1 Elution von DNA aus Agarosegelen	42
2.2.2.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	42
2.2.2.3 Transformation von <i>S. pombe</i>	42
2.2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.2.6 DNA-Sequenzanalysen.....	43
2.2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	43
2.2.2.8 Klonierung verschiedener Plasmide	44
2.2.2.9 Durchführung eines DNA-Microarrays.....	45
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.3.1 Proteinbestimmung	46
2.2.3.2 Isolierung von Proteinen	47
2.2.3.3 TCA-Fällung von Proteinen	47
2.2.3.4 Auf trennung und Nachweis von Proteinen	47
2.2.3.5 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	48
2.2.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz	48
2.2.3.7 Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität	49
2.2.3.8 CPY-Pulse-Chase.....	49
2.2.3.9 SDH-Aktivitätstest.....	50
2.2.3.10 Prolin-Oxidase-Aktivitätstest.....	50
2.2.3.11 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an der Amylosesäule	51

2.2.4	Weitere Methoden.....	51
2.2.4.1	Auftrennung von Riboflavin, FMN und FAD mittels Dünnschichtchromatographie.....	51
2.2.4.2	Aufnahmetests in Hefe	51
2.2.4.2.1	Riboflavinaufnahme	51
2.2.4.2.2	Biotinaufnahme	52
2.2.4.2.3	Glucoseaufnahme	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Identifizierung und Charakterisierung des Riboflavintransporters in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	53
3.1.1	Gentechnischer Ansatz zur Identifizierung eines Plasmamembrantransporters für Riboflavin	53
3.1.1.1	Überexpression von <i>MCH5</i> komplementiert den Wachstumsphänotyp von <i>rib4Δ</i> - und <i>rib5Δ</i> -Mutanten.....	54
3.1.1.2	Die Überexpression von <i>MCH5</i> komplementiert auch andere <i>ribΔ</i> -Mutanten.....	56
3.1.1.3	Verstärkung des Wachstumsphänotyps durch die Deletion von <i>MCH5</i> in den Riboflavinbiosynthesemutanten.....	57
3.1.1.4	Beteiligung der <i>MCH1-MCH4</i> -Gene am riboflavinabhängigen Wachstum.....	58
3.1.1.5	Auftreten von <i>rib*</i> -Mutanten	61
3.1.2	Überprüfung FAD abhängiger Reaktionen in WT-, <i>rib5Δ</i> - und <i>rib5Δ mch5Δ</i> -Stämmen.....	62
3.1.2.1	Reifungsdefekte der Carboxypeptidase Y (CPY) in den <i>mch5Δ</i> -Mutanten.....	62
3.1.2.2	Bestimmung der Succinatdehydrogenase (SDH) Aktivität der <i>mch5Δ</i> -Mutanten	64
3.1.3	Lokalisation von Mch5p in <i>S. cerevisiae</i>	65
3.1.4	Überexpression von <i>MCH5</i> steigert die Riboflavinaufnahme	67
3.1.4.1	Transport von Riboflavin in <i>S. cerevisiae</i>	68
3.1.4.2	Riboflavintransport in <i>rib4Δ</i> -Mutanten	69
3.1.4.3	Heterologe Expression von <i>MCH5</i> in <i>S. pombe</i>	70
3.1.5	Bestimmung der kinetischen Konstanten von Mch5p	72
3.1.5.1	Bestimmung des pH-Optimums.....	72
3.1.5.2	Bestimmung des <i>K_m</i> -Werts.....	73
3.1.5.3	Energetisierung der Riboflavinaufnahme.....	74
3.1.5.4	Untersuchung von Kompetitoren der Riboflavinaufnahme	76
3.2	Expressionsanalyse von <i>rib5Δ</i>-Mutanten.....	78
3.3	Riboflavinabhängige Regulation der <i>MCH5</i>-Expression	82
3.3.1	Expression von <i>MCH5</i> in Abhängigkeit der Riboflavinkonzentration	82
3.3.2	Identifizierung von Transkriptionsfaktorbindestellen im <i>MCH5</i> -Promotor	84
3.3.3	<i>MCH5</i> wird durch Put3p reguliert	86
3.3.4	Expression von <i>MCH5</i> in Abhängigkeit der Stickstoffquelle	88
3.3.5	Weitere Untersuchungen zur Aktivierung von <i>MCH5</i> durch Put3p	90
3.3.6	Untersuchungen zur Riboflavinwahrnehmung über die intrazelluläre Prolinkonzentration.....	93
3.4	Herstellung eines Antikörpers gegen Mch5p.....	97
4	Diskussion	99
4.1	Riboflavintransport in <i>S. cerevisiae</i>	99
4.1.1	Identifizierung und Charakterisierung von Mch5p, dem Riboflavintransportprotein	99
4.1.2	Funktionen von Mch5p-Homologen.....	103
4.1.3	Besonderheiten der Riboflavinbiosynthesemutanten.....	105
4.2	Wahrnehmung von verfügbarem Riboflavin durch <i>S. cerevisiae</i>	106
4.2.1	Regulation des Stickstoffmetabolismus.....	106
4.2.1.1	Allgemeines.....	107
4.2.1.2	Regulation des Prolinmetabolismus	108
4.2.2	Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin in <i>S. cerevisiae</i>	110
5	Zusammenfassung	114
6	Literatur	115

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Ade	Adenin
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
AS	Ammoniumsulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CPY	Carboxypeptidase Y
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
d	Tag
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
INT	1-(4-Iodophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylformazan, Iodonitrotetrazolium Formazan
IPTG	1-Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MBP	Maltosebindeprotein
Met	Methionin
min	Minute
OD	Zellmenge (1 OD entspricht ca 10^7 Hefezellen)
OD ₆₀₀	Optische Dichte (Lichtstreuung durch 1 ml Zellsuspension bei $\lambda = 600$ nm)
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pro	Prolin
Prom	Promotor

RT	Raumtemperatur
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tritc	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
üN	über Nacht
Ura	Uracil
WT	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Base

1 Einleitung

1.1 Riboflavin

1.1.1 Allgemeines

Riboflavin ist ein Vitamin der B-Gruppe (Vitamin B₂) und für Säuger essentiell. Es hat ein Molekulargewicht von 376,36 g/mol und kristallisiert als gelbe Nadeln. Sein Schmelzbereich liegt zwischen 271 und 293 °C und es ist in Wasser bis zu 130 mg/l (bei 27 °C) löslich (Bässler *et al.* 2002; Kurth *et al.* 2005). Riboflavin ist stabil gegen Hitze, wird aber durch Licht rasch zersetzt. In neutraler oder schwach saurer Lösung wird es unter Lichteinwirkung zu Lumichrom und in alkalischer Lösung zu Lumiflavin umgesetzt. Die Summenformel ist C₁₇H₂₀N₄O₆, der IUPAC-Name lautet 7,8-Dimethyl-10-(1-D-ribityl)-2,4(3H,10H)benzopteridinon.

In vielen Organismen ist Riboflavin nach der Definition für Vitamine keines, da es sich nur bei Substanzen die der jeweilige Organismus nicht über Biosynthese herstellen kann, um Vitamine handeln kann. Die im allgemeinen Sprachgebrauch als Vitamine bezeichneten Substanzen sind im menschlichen Organismus essentiell. Obwohl Riboflavin in allen eukaryontischen Zellen enthalten ist, gibt es nur sehr wenige Nahrungsmittel die gute Quellen für Riboflavin sind. Sehr hohe Konzentrationen an Riboflavin sind in Hefe und in Leber zu finden, jedoch spielen in der menschlichen Ernährung hauptsächlich Nahrungsmittel wie Milch, Milchprodukte, Eier, Fleisch und grüne Blattgemüse eine wichtige Rolle. In Milch liegt 90 % des enthaltenen Riboflavins in freier Form vor, während es in den meisten anderen B₂-Quellen proteingebunden ist. Vitamin B₂ und seine Derivate werden mit Hilfe der Magensäure im Magen freigesetzt und dann überwiegend in freier Form im oberen Dünndarm resorbiert.

Beispiele historischer Bezeichnungen für Riboflavin, die aufgrund ihrer Isolation aus verschiedenen Ausgangsprodukten gewählt wurden, sind Ovoflavin (aus Eiern), Lactoflavin (aus Milch) oder Uroflavin (aus Urin). Die erste Isolierung von Riboflavin erfolgte bereits 1879 durch Blyth (Blyth 1879). Er isolierte bei der Analyse der Zusammensetzung von Kuhmilch einen gelben Bestandteil, den er Lactochrom nannte und von dem später gezeigt werden konnte, dass es sich dabei um den Stoff handelte, der heute als Riboflavin bekannt ist. Im Jahr 1913 erkannten Osborne und Mendel durch Fütterungsexperimente mit Ratten, dass in Kuhmilch neben Zucker, Proteinen und Fett ein wasserlöslicher Wachstumsfaktor

vorhanden sein muss (Osborne und Mendel 1913). Emmett und McKim erkannten 1917, dass in Extrakten aus Brauhefe zwei verschiedene wasserlösliche Vitamine enthalten sein müssen, da eine der Vitaminpräparationen zur Heilung von Polyneuritis bei Tauben und die andere zu einer Gewichtszunahme der Tiere führte (Emmett und McKim 1917). 1932 isolierten Warburg und Christian ein gelbes Enzym aus wässrigem Hefeextrakt (Warburg und Christian 1932) und konnten es ein Jahr später in eine Proteinkomponente und einen Farbstoff auftrennen. Weder der Farbstoff noch das Protein alleine zeigten eine enzymatische Aktivität (Warburg und Christian 1933). 1933 konnten György *et al.* Riboflavin aus Hühnereigelb isolieren und kristallisieren (György *et al.* 1933). Die Struktur von Riboflavin konnte zwischen 1933 und 1935 durch Kuhn *et al.* und Karrer *et al.* nahezu zeitgleich aufgeklärt werden (Karrer *et al.* 1935; Kuhn *et al.* 1935). Die Struktur von Riboflavin ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

Pflanzen, der Großteil der Prokaryonten und auch Hefen können Riboflavin *de novo* synthetisieren. Bei Bakterien sind wenige auxotrophe Ausnahmen bekannt, wie manche Angehörige der Gattung *Lactobacillus* (Koser 1968). Diese Bakterien leben hauptsächlich in Milch und Milchprodukten, in denen Riboflavin in hoher Konzentration vorkommt. Möglicherweise haben diese Spezies aus Gründen der hohen Verfügbarkeit von Riboflavin die Fähigkeit zur Biosynthese verloren.

Für Menschen ist eine Aufnahme von 0,8-0,9 mg Riboflavin pro Tag ausreichend, um Mangelsymptome zu verhindern. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung (2001) empfiehlt für Frauen eine Aufnahme von 1,2 mg, für Schwangere 1,5 mg und für Männer abhängig vom Alter zwischen 1,2 und 1,5 mg pro Tag, wobei der Bedarf mit steigendem Alter sinkt (DGE 2001). Ein Mangel an Riboflavin (Ariboflavinosis) verursacht Symptome wie Exantheme (entzündliche Hautveränderungen), Hautrisse und Rötungen nahe der Augen- und Mundwinkel (Cheilosis) sowie Lichtüberempfindlichkeit (Photophobie). Ein Riboflavinmangel ist bei in Industriestaaten lebenden Menschen jedoch praktisch unbekannt. In der menschlichen Ernährung findet zugesetztes Riboflavin meist nur als Farbstoff (E 101) Verwendung. Riboflavin wird häufig zum Futter für Geflügel und Schweine zugegeben. Bei diesen Tieren führt Riboflavinmangel zu Wachstumshemmung, schlechter Futterverwertung und zu Diarröh. Legehennen haben aufgrund der hohen Eierproduktion einen deutlich erhöhten Bedarf an Riboflavin. Bei ihnen äußert sich Riboflavinmangel durch nach innen gebogene Krallen.

1.1.2 Industrielle Synthese von Riboflavin

Bis vor einigen Jahren hatte die chemische Synthese von Riboflavin große Bedeutung. Der Verlauf wird in den Abbildungen 1-1 (Synthese von D-Ribose) und 1-2 (Synthese von Riboflavin) dargestellt. Eines der Ausgangsprodukte ist Glucose (1), die zu Ribose (8) umgesetzt wird. Zur Herstellung von Ribose können drei verschiedene Prozesse eingesetzt werden, die in Abbildung 1-1 dargestellt sind.

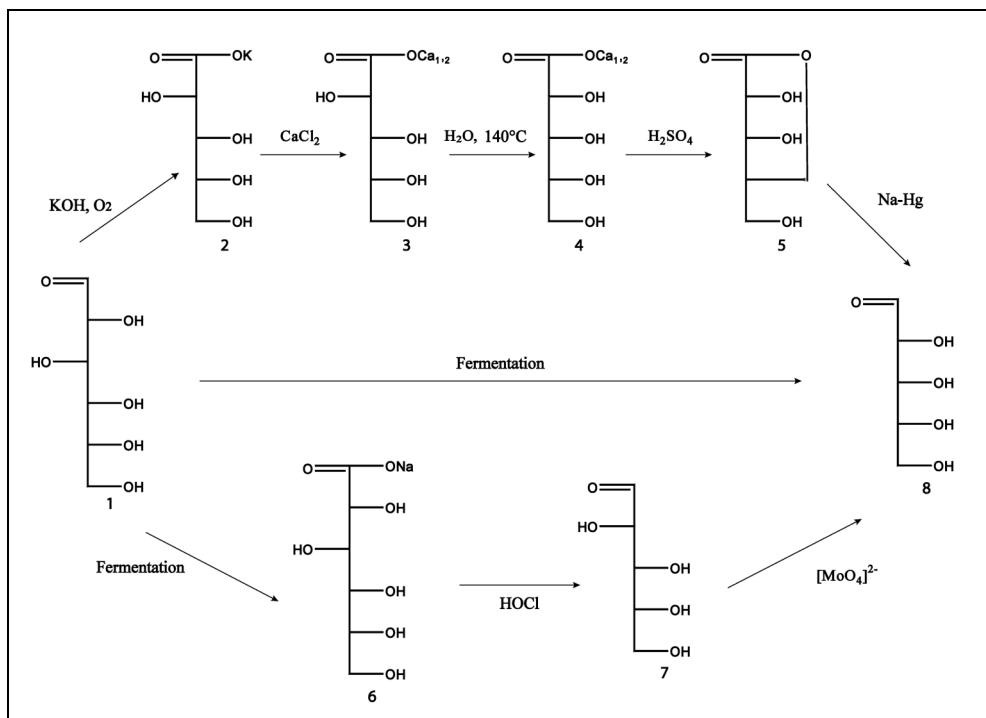


Abb. 1-1: Chemische Synthese von D-Ribose aus D-Glucose. Abbildung nach Kurth *et al.* (2005). Erläuterungen siehe Text.

Bei der rein chemischen Synthese von Ribose wird Glucose zu Kaliumarabonat (2) umgesetzt und durch Zugabe von CaCl₂ wird Arabonat als Calciumsalz gefällt (3). Das in Wasser gelöste Salz wird erhitzt, wodurch Calcium-D-Ribonat (4) entsteht. Daraus wird D-Ribonolacton (5) hergestellt, welches durch Natriumamalgam zu Ribose (8) reduziert wird. Diese daraus erhaltene Lösung kann ohne weitere Aufreinigung zur Synthese von Riboflavin eingesetzt werden (Kurth *et al.* 2005).

In den beiden anderen Prozessen werden fermentative Verfahren zur Gewinnung der Ribose eingesetzt. In einem moderneren Verfahren wird Glucose zunächst fermentativ zu Natrium-D-Gluconat (6) oxidiert, welches durch Hydrogenhypochlorid oxidativ zu D-Arabinose (7) umgesetzt wird. Die D-Arabinose wird auskristallisiert und zu D-Ribose umgesetzt (Kurth *et al.* 2005).

Der dritte Prozess zur Gewinnung von D-Ribose (8) ist rein fermentativ. D-Glucose wird hier durch gentechnologisch optimierte *Bacillus*-Spezies zu D-Ribose umgesetzt (Park *et al.* 2004). Aus diesem Ansatz wird die Biomasse abgetrennt und die D-Ribose aus einer Wasser-Ethanol Lösung auskristallisiert (Hiroshi *et al.* 1986; Kishimoto *et al.* 1990).

Die mit den oben genannten Prozessen synthetisierte Ribose wird in der kommerziellen chemischen Synthese von Riboflavin eingesetzt. Hauptsächlich findet die Umsetzung nach Karrer *et al.* (1935) und Tishler *et al.* (1947) Anwendung (siehe Abbildung 1-2). Hierzu lässt man 3,4-Xyldin in Methanol mit D-Ribose zu einem Ribosid reagieren und hydrogeniert dieses katalytisch zu N-(3,4-Dimethylphenyl)-D-1'-Ribamin (9). Durch Kopplung von N-(3,4-Dimethylphenyl)-D-1'-Ribamin mit Phenylazoniumchlorid entsteht N-(2-Phenylazo-4,5-Dimethylphenyl)-D-1'-Ribamin (10). Dieses wird in schwach saurer Lösung durch Cyclo kondensation mit Barbitursäure (11) zu Riboflavin umgesetzt.

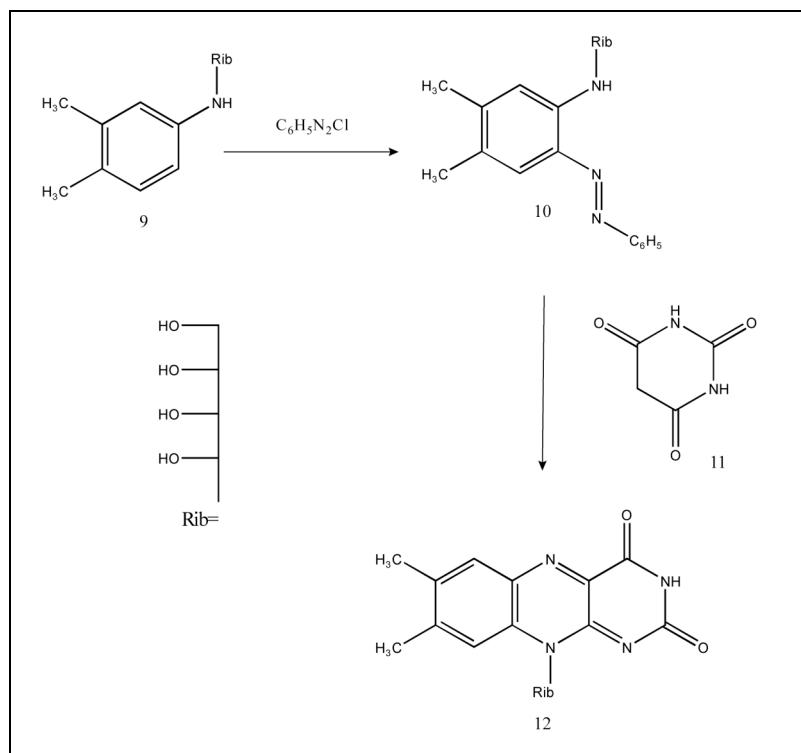


Abb. 1-2: Chemische Synthese von Riboflavin Abbildung nach Kurth *et al.* (2005). Erläuterungen siehe Text.

Heute wird der Großteil des industriell hergestellten Riboflavin durch Biosynthese aus *Ashbya gossypii* (*A. gossypii*), *Candida famata* (*C. famata*) und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) gewonnen (Stahmann *et al.* 2000). Vorteile dieser biotechnologischen Synthese sind einerseits, dass die auf Mineralöl basierende chemische Synthese durch erneuerbare Ausgangsprodukte ersetzt werden kann, andererseits kann mit der Herstellung von Riboflavin durch Mikroorganismen eine Verunreinigung des Riboflavins durch Spuren von Anilin

vermieden werden. Bereits 1965 wurde Riboflavin von drei Firmen durch Fermentation hergestellt, die Produktion jedoch nach drei Jahren aufgrund ihrer Unwirtschaftlichkeit wieder eingestellt (Lago und Kaplan 1981). In den darauffolgenden Jahren wurden durch Mutagenese Stämme hergestellt, die Riboflavin überproduzieren. Die Isolierung gestaltete sich einfach, da die Stämme durch eine Gelbfärbung der Kolonien identifiziert werden können. 1990 wurde von BASF eine Produktionsanlage mit gentechnisch verändertem *A. gossypii*, der bis zu 15 g/l Riboflavin produziert, parallel zur chemischen Synthese in Betrieb genommen und seit 1996 stellt BASF dieses Vitamin ausschließlich durch Fermentation (Stahmann *et al.* 2000) her. Die Firma Roche produziert Riboflavin seit 1999 mit einem rekombinanten *B. subtilis* Stamm. Die nach Kristallisation erhaltene Reinheit des fermentativ hergestellten Riboflavins übersteigt die aus der chemischen Synthese (Bretzel *et al.* 1999).

1.1.3 Biosynthese von Riboflavin, FMN und FAD

Der Biosyntheseweg von Riboflavin, FMN und FAD ist bei Bakterien und Hefen bereits sehr gut aufgeklärt. Die Riboflavinbiosynthese erfolgt sowohl in Bakterien als auch in Hefen über sieben spezifische Reaktionen (siehe Abbildung 1-3). Die Biosynthese von FAD wird über zwei weitere Schritte, die ebenfalls in Abbildung 1-3 schematisch dargestellt sind, katalysiert (nach Fischer und Bacher (2005)). In Tabelle 1-1 ist eine Übersicht über die Reaktionsprodukte der Biosynthese und in Tabelle 1-2 eine Übersicht der Enzyme und deren Gene in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) aufgelistet.

A	GTP
B	2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidindion-5'-phosphat
C	5-Amino-6-(5'-phosphoribosylamino)uracil
D	2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon 5'-phosphat (DRAP)
E	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion 5'-phosphat
F	5-Amino-6-ribitylamino -2,4(1H,3H)-pyrimidindion
G	Ribulose 5'-phosphat
H	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat
I	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin
J	Riboflavin
K	FMN
L	FAD

Tabelle 1-1: Übersicht über die Reaktionsprodukte der Riboflavin- und FAD-Biosynthese

Die Ausgangsprodukte für ein Molekül Riboflavin sind ein Molekül GTP und zwei Moleküle Ribulose-5'-phosphat. Im ersten Schritt katalysiert die GTP-Cyclohydrolase II (I) die Ringöffnung am GTP (A) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (B).

Das für die GTP-Cyclohydrolase II kodierende Gen in *S. cerevisiae* heißt *RIB1*, identifiziert durch Oltmanns und Bacher (1972), das in *E. coli ribA*, erstmals beschrieben von Richter *et al.* (1993). Während die erste Reaktion in allen Mikroorganismen vorkommt, verlaufen die zwei folgenden Syntheseschritte in Pro- und Eukaryonten unterschiedlich. Bei *E. coli* erfolgt die Synthese von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (E) durch das bifunktionelle Enzym *ribD* (Richter *et al.* 1997) das (B) zunächst über die Pyrimidin-Deaminase-Aktivität (II) zu 5-Amino-6-(5'-phosphoribosylamino)uracil (C) deaminiert und dann durch die Pyrimidin Reduktaseaktivität (IV) zu (E) umgesetzt. In *S. cerevisiae* wird (B) zunächst durch die Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidin Deaminaseaktivität (III), kodiert durch *RIB7* (Oltmanns und Bacher 1972), zu 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon 5'-phosphat (D) reduziert und dann durch die DRAP-Deaminaseaktivität, kodiert durch *RIB2* (Oltmanns und Bacher 1972), zu (E) deaminiert. Das Zwischenprodukt (E) muss für den weiteren Biosyntheseweg zu Riboflavin über eine Pyrimidin-Phosphatase (VI) zunächst zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (F) dephosphoryliert werden; die Gene für dieses Enzym sind sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* bislang unbekannt. Die Biosynthese von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (H), das zur Kondensation von (F) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (I) benötigt wird, wird in einem zweiten Weg aus Ribulose-5'-phosphat (G) durch die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthetase (VII) katalysiert. Die Gene für dieses Enzym sind sowohl in *E. coli* (*ribB*) (Richter *et al.* 1992) als auch in *S. cerevisiae* (*RIB3*) (Jin *et al.* 2003) beschrieben worden. Die Kondensation von (H) und (F) zu (I) wird durch die Lumazin-Synthetase (VIII) katalysiert. In *E. coli* wird dieses Enzym durch *ribE* (Mortl *et al.* 1996) und in *S. cerevisiae* durch *RIB4* (Garcia-Ramirez *et al.* 1995) kodiert. Diese durch die Lumazin-Synthase katalysierte Reaktion kann jedoch auch unkatalysiert ablaufen (Kis *et al.* 2001). Dies könnte auch der Grund sein, weshalb die Deletion von *RIB4*, im Gegensatz zu den anderen Riboflavinbiosynthesegenen lebensfähige Zellen liefert (Winzeler *et al.* 1999). Die Synthese von Riboflavin (J) erfolgt über die Riboflavin-Synthetase (IX), die in *E. coli* durch *ribC* (Eberhardt *et al.* 1996) und in *S. cerevisiae* durch *RIB5* (Eberhardt *et al.* 1996) kodiert wird. Bei diesem Schritt erfolgt eine Dismutation von zwei Molekülen (I) zu einem Molekül (J) und einem Molekül (F), welche erneut die Reaktionen, die durch (VIII) und (IX) katalysiert werden, durchlaufen.

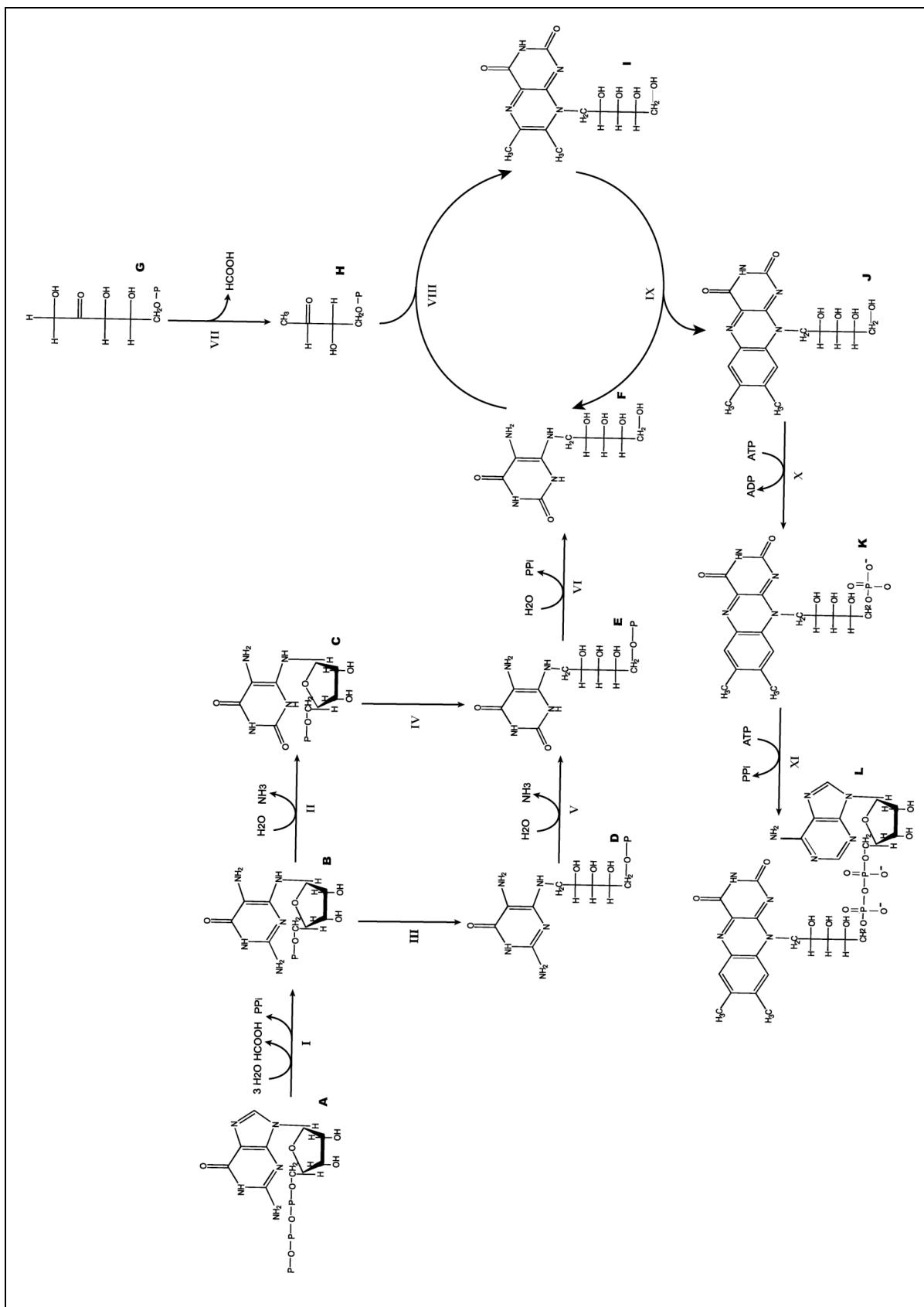


Abb. 1-3: Riboflavin und FAD-Biosynthese bei *E. coli* und *S. cerevisiae* Abbildung aus Fischer und Bacher (2005). Erläuterungen siehe Text.

	Enzym	Gennamen in	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
I	GTP Cyclohydrolase II	<i>RIB1</i>	<i>ribA</i>
II	Pyrimidin Deaminase		<i>ribD</i>
III	Diaminohydroxyphospho-ribosylamino-pyrimidin Deaminase	<i>RIB7</i>	
IV	Pyrimidin Reduktase		<i>ribD</i>
V	DRAP Deaminase	<i>RIB2</i>	
VI	Pyrimidin Phosphatase	unbekannt	unbekannt
VII	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthetase	<i>RIB3</i>	<i>ribB</i>
VIII	Lumazin Synthetase	<i>RIB4</i>	<i>ribE</i>
IX	Riboflavin Synthetase	<i>RIB5</i>	<i>ribC</i>
X	Riboflavin Kinase	<i>FMN1</i>	<i>ribF</i>
XI	FAD Synthetase	<i>FAD1</i>	<i>ribF</i>

Tabelle 1-2: Übersicht der Enzyme der Riboflavinbiosynthese und der entsprechenden Gene in *S. cerevisiae* und *E. coli*

Die Phosphorylierung von (J) zu FMN (K) wird durch die Riboflavin-Kinase (X) unter Umsetzung von ATP zu ADP katalysiert. In *S. cerevisiae* wird dieses Enzym durch *FMN1* (Santos *et al.* 2000) kodiert und in *E. coli* durch das Gen *ribF* (Mack *et al.* 1998). Letzteres ist bifunktionell und stellt auch die FAD Synthetase (XI) dar. Die Reaktion von FMN mit ATP zu FAD über (XI) erfolgt unter Abspaltung von zwei Molekülen anorganischen Phosphats. Das Enzym wird in *S. cerevisiae* durch das Gen *FAD1* (Wu *et al.* 1995) kodiert.

Obwohl menschliche Zellen kein Riboflavin synthetisieren können sind sie in der Lage, aufgenommenes Riboflavin zu FMN und FAD umzusetzen. Das Gen für die Riboflavin-Kinase *hsRFK* (Karthikeyan *et al.* 2003) konnte bereits identifiziert werden.

1.1.4 Physiologische Bedeutung von FMN und FAD

Riboflavin ist in Form von FMN oder FAD häufig als Coenzym bzw. prosthetische Gruppe in Flavoproteinen enthalten. Flavoenzyme katalysieren viele biochemische Reaktionen. Sie sind an vielen Reaktionen, wie der Dehydrogenierung von Metaboliten, der Elektronenübertragung in Redoxreaktionen, der Emission von Licht und der Aktivierung von Sauerstoff für Oxidations- und Hydroxylierungsreaktionen beteiligt. Es gibt eine große Anzahl von Flavoproteinen. In der Protein Data Bank (PDB) sind bereits über 200 Einträge FMN und FAD abhängiger Proteine vorhanden (Fraaije und Mattevi 2000).

Eine Klasse der Flavoenzyme sind Dehydrogenasen. Zu diesen gehört die Succinat-Dehydrogenase, die bei allen aeroben Organismen eine große Rolle spielt und FAD als Cofaktor enthält. Sie kommt im dritten Oxidationsschritt des Citronensäure-Zyklus vor und übernimmt bei der Umsetzung von Succinat zu Fumarat zwei Wasserstoffatome (Singer und Johnson 1985). Ein weiteres Beispiel für diese Art von Flavoproteinen ist die FAD enthaltende Acyl-CoA Dehydrogenase, welche eine wichtige Rolle in der mitochondriellen β -Oxidation von Fettsäuren spielt.

Zwei Beispiele für Flavoprotein-Oxidasen, die beide FAD kovalent gebunden haben, sind die L-Galactono-1,4-lacton-Oxidase und die L-Gulonolacton-Oxidase. Sie katalysieren, je nach Biosyntheseweg (der sich bei verschiedenen Organismen unterscheidet), den vorletzten Schritt der Ascorbinsäurebiosynthese. Je nach Organismus wird L-Galactolacton bzw. L-Gulonolacton zu 2-Dehydrolacton und Wasserstoffperoxid umgesetzt, wobei die Wasserstoffionen direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Bleeg und Christensen 1982). Weitere Oxidasen sind D-Aminosäure- und D-Aspartat-Oxidasen, die FAD in ihrem reaktivem Zentrum haben. Die D-Aminosäure-Oxidase katalysiert die oxidative Deaminierung von einigen Aminosäuren, jedoch nicht die von Asparaginsäure und Glutaminsäure. Deren Deaminierung wird von der D-Aspartat-Oxidase übernommen. Durch diese Oxidasen werden D-Aminosäuren mit Wasser und molekularem Sauerstoff zu α -Ketosäure, Ammoniak und Wasserstoffperoxid umgesetzt (D'Aniello *et al.* 1993).

Eine weitere Klasse der Flavoenzyme sind Disulfid-Oxidoreduktasen, zu denen auch die FAD-tragende Glutathion-Reduktase gehört. Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, das in vielen biochemischen Reaktionen als Reduktionsmittel fungiert und dabei zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Die Glutathion-Reduktase katalysiert die Rückführung von GSSG zu GSH, sodass letzteres wieder als Reduktionsmittel zur Verfügung steht (Carlberg und Mannervik 1975). Eine ebenfalls sehr wichtige Funktion für Disulfid-Oxidoreduktasen ist die Ausbildung von Disulfidbrücken bei der Faltung von Proteinen im endoplasmatischen Reticulum (ER). Im Gegensatz zum stark reduzierenden Milieu im Cytosol herrschen im ER für die Proteinfaltung optimierte Bedingungen. So kommen im ER viele Hilfsenzyme der Proteinfaltung wie Chaperone (Hsp70), Peptidyl-Prolin-Isomerasen und Proteindisulfid-Isomerasen vor. Weiterhin findet im ER eine Qualitätskontrolle statt, die so genannte „unfolded protein response“ (UPR). Diese verhindert, dass nicht vollständig gereifte Proteine das ER verlassen. Proteine des sekretorischen Wegs aus dem ER unterscheiden sich von den cytosolischen Proteinen deutlich in der Menge der enthaltenen Disulfidbrücken. Das Milieu im ER darf jedoch nicht zu stark oxidierend sein, da sonst alle Cysteine auch unkontrolliert zu Cystinen oxidiert würden. Von Pollard *et al.* (1998) konnte in *S. cerevisiae* das FAD tragende

Flavoprotein Ero1p identifiziert werden, durch das die definierte Ausbildung von Disulfidbrücken im ER katalysiert wird. Zu diesem Protein konnten in zahlreichen anderen Organismen homologe Proteine gefunden werden.

Ein weiteres sehr wichtiges Flavoenzym ist die Photolyase. Sie besteht aus einem Apoprotein, einer Antenneneinheit (Methylhydrofolat oder 5-Deazaflavin) und FAD als Funktionseinheit. Dieses Enzym katalysiert die Reparatur von den durch UV-Licht in der DNA verursachten Mutationen. Es gibt zwei verschiedene Arten der Mutation durch UV-Licht, die stets die Pyrimidinbase betreffen. Eine Veränderung einer Pyrimidinbase ist die Umsetzung zu Pyrimidon, die jedoch nicht von der Photolyase, sondern durch die „nucleotide excision repair“ (NER) repariert wird. Bei diesem Vorgang muss die Mutation zunächst durch verschiedene Proteine erkannt werden. Hiernach wird das die Mutation enthaltende Stück der DNA von anderen Enzymen herausgeschnitten und das Stück neu repliziert. Bei den anderen durch UV-Licht verursachten Mutationen der Pyrimidinbasen werden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) gebildet. Bei der Photoreaktivierung durch die Photolyase bindet das Enzym direkt an die CPDs, dreht diese nach außen und ersetzt die mutierten Pyrimidine durch Native in einer lichtabhängigen Reaktion. Dabei absorbiert die Antenne das Licht und transferiert die Energie auf FAD (Thoma 1999).

Neben Flavoenzymen gibt es auch Flavinsensoren. In vielen Organismen von Prokaryonten bis hin zum Menschen kommen in der Gruppe der Blaulichtphotopigmente die Cryptochrome vor. Diese Proteinklasse hat sowohl in der Sequenz als auch in der Struktur große Ähnlichkeit zu Photolyasen. Die Cryptochrome bestehen ebenfalls aus einem Apoprotein, einer Antenneneinheit (Methylhydrofolat oder 5-Deazaflavin) und FAD als Funktionseinheit, jedoch haben sie keine Fähigkeit zur DNA-Reparatur. Die Cryptochrome nutzen die Energie des Blaulichts zur Regulation einer Vielzahl von Wachstums- und Umgebungsanpassungen. Die Gene der Cryptochrome wurden durch die Isolierung von *HY4* Mutanten in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gefunden, die unter ausschließlicher Bestrahlung mit Blaulicht die gleichen Wachstumsdefizite zeigten wie Pflanzen, die im Dunkeln angezogen wurden (Ahmad und Cashmore 1993). Ein wichtiges Beispiel für die Funktion von Cryptochromen ist die Synchronisation der circadianen Uhr (lat.: *circa diem* – ungefähr eine Tageslänge) mit den Tageslängen. Die molekular vorhandene „Innere Uhr“ zeigt auch im Dunkeln einen Rhythmus von ungefähr 24 Stunden, aber sie hält diesen Rhythmus nicht exakt. Der Rhythmus muss täglich durch die Umgebung synchronisiert werden, was hauptsächlich durch die Signale des Tag-Nacht Wechsels geschieht (Partch und Sancar 2005).

Die Untersuchungen des Phototropismus haben zur Entdeckung eines neuen Blaulicht-photorezeptors, dem Phototropin, geführt. Phototropine sind in *A. thaliana* für den durch Blaulicht induzierten Phototropismus des Hypocotyls, für die Öffnung der Stomata und für die Expansion der Blätter verantwortlich. In *A. thaliana* konnten zwei Gene (*phot1* und *phot2*) für Phototropine identifiziert werden. Jedes dieser Phototropine besteht aus zwei LOV-Domänen (engl.: light, oxygen and voltage), an die jeweils ein Molekül FMN gebunden ist, sowie einer Kinase-Domäne. Die LOV-Domänen absorbieren durch das gebundene FMN-Chromophor blaues Licht. Die Kinase-Domäne scheint mit der Signaltransduktion in Verbindung zu stehen. Phototropine sind nach heutigem Stand der Forschung nur im Pflanzenreich vorhanden (Kagawa 2003). Durch BLUF-Photorezeptoren (engl.: blue light sensors using FAD) wird beispielsweise die Phototaxis, eine lichtinduzierte freie Ortsbewegung ein- oder wenigzelliger Organismen, gesteuert. (Okajima *et al.* 2005)

Ein gutes Beispiel für flavinabhängige Biolumineszenz sind die erstmalig in *Vibrio fischeri* entdeckten Luciferase Gene *luxA* und *luxB*. Die bakterielle Luciferase aktiviert mit Hilfe von FMN molekularen Sauerstoff, um ein Flavin C4a Peroxid zu bilden. Die Reaktion des C4a Peroxids mit einem aliphatischen Aldehyd als Substrat ergibt im Übergangszustand Kohlensäure und ein Flavin-C4a Hydroxid. Bei der Dissoziation des FMN und Verlust des C4a Hydroxids entsteht Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm; das Enzym kehrt daraufhin in seine Ausgangskonformation zurück. Dies geschieht nach folgender Reaktionsgleichung:



Das Luciferase-Gen wird häufig als Reporter für die Untersuchung von Genexpression in vielen Organismen verwendet. Durch die Anwendbarkeit im Labor gewinnt die Luciferase an biotechnologischer Bedeutung (Meighen 1993).

1.2 Vitamintransport

Vitamine werden in jeder lebenden Zelle benötigt und müssen somit entweder von der Zelle selbst hergestellt werden oder über die Zellmembran in das Innere gelangen. Wasserlösliche Vitamine sind für eine gute passive Diffusion über die Zellmembranen zu groß und zu hydrophil. Aus diesem Grund müssen in den Membranen Transportproteine vorhanden sein, um eine effiziente Aufnahme zu gewährleisten. In Kapitel 1.2.1 soll ein Überblick über einzelne, bereits identifizierte Vitamintransportproteine in *S. cerevisiae* und in *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) gegeben werden. In Kapitel 1.2.2 wird auf Untersuchungen zum Riboflavintransport in verschiedenen Organismen eingegangen.

1.2.1 Vitamintransportproteine in *S. cerevisiae* und *S. pombe*

S. cerevisiae und *S. pombe* werden als eukaryontische Modellorganismen verwendet. Diese Hefen haben sich vor etwa 420 bis 330 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt und sind wenig miteinander verwandt (Sipiczki 2000). Sie sind in der Lage, die meisten Vitamine mittels Biosynthese selbst herzustellen. Jedoch konnte bei Untersuchungen von *S. cerevisiae* festgestellt werden, dass alle der untersuchten Stämme Biotin und Pantothenensäure auxotroph sind. Einzelne der untersuchten *S. cerevisiae* Stämme benötigen zum Wachstum das für Menschen nicht essentielle Inositol; einer der Stämme ist auxotroph für Thiamin. Für alle der untersuchten *S. pombe* Stämme sind Biotin und Inositol lebenswichtig. Pantothenensäure ist für die meisten der untersuchten Stämme essentiell, für alle Stämme ist sie jedoch zumindestens wachstumsfördernd. Für einen Teil der Stämme ist auch noch Nicotinsäure lebenswichtig. Pyridoxin und Thiamin wirkt bei manchen Stämmen wachstumsstimulierend (Koser 1968).

Im Folgenden wird zunächst auf die Transportproteine der für beide Hefen essentiellen Vitamine eingegangen. Der Transport von Inositol wird nicht behandelt, da dieses bei höheren Eukaryonten als Vitamin keine Rolle spielt. Es steht außer Frage, dass für die lebenswichtigen Vitamine in Hefe ein System zum Transport über die Plasmamembran existieren muss. Die Transportproteine für Biotin und Pantothenensäure konnten bereits in beiden Hefen identifiziert und charakterisiert werden. All diese Proteine gehören zur Familie der Dal5-Proteine. Der phylogenetische Baum der Dal5p-Familie ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Dal5p ist sowohl für den Transport von Allantoinsäure als auch für den Transport von Ureidosuccinat über die Plasmamembran von *S. cerevisiae* verantwortlich (Turoscy und Cooper 1987).

Die Identifizierung des Transportproteins für Biotin in *S. cerevisiae* wurde von Stolz *et al.* (1999) beschrieben. Biotin ist ein wichtiger Cofaktor der Acetyl-CoA-Carboxylase 1 (Acc1p), die den ersten Schritt in der Biosynthese von Fettsäuren katalysiert. Ein Mangel an Biotin in der Zelle führt somit zu einer Auxotrophie für Fettsäuren. Durch Komplementation einer Fettsäure-auxotrophen Mutante von *S. cerevisiae* gelang es, das Gen *VHT1* (Vitamin H transporter 1) zu identifizieren. Vht1p ist ein hochaffines Transportprotein für Biotin und hat einen K_m -Wert von 0,3 µM. Für den Biotintransport in *S. cerevisiae* wurde dies bereits von Rogers und Lichstein (1969) beschrieben. Die Aufnahme von Biotin kann durch Zugabe von Protonophoren inhibiert und durch Zugabe von Glucose stimuliert werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei dem Mechanismus der Biotinaufnahme um einen Protonensymport handelt. Die Expression des Transporters ist außerdem in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Biotin im Medium reguliert. Von den Autoren konnte gezeigt werden, dass

mit sinkender Biotinkonzentration die Expression von *VHT1* steigt (Stolz *et al.* 1999). Zur Identifizierung des Biotintransporters in *S. pombe* wurde von Stolz (2003) ein *S. cerevisiae* *vht1Δ*-Stamm mit einer *S. pombe* cDNA-Bank transformiert und nach Transformanten gesucht, die mit einer für die Mutanten zu niedrigen Biotinkonzentration erneut wachsen konnten. Mit dieser Methode konnte das Gen *vht1⁺* gefunden werden. Ebenso wie *VHT1* codiert auch *vht1⁺* für ein hochaffines Transportprotein mit einem K_m -Wert von 0,23 μM, ist ebenfalls durch Protonophoren inhibierbar und durch Glucose stimulierbar. Somit handelt es sich auch bei *vht1⁺* um einen Protonensymporter.

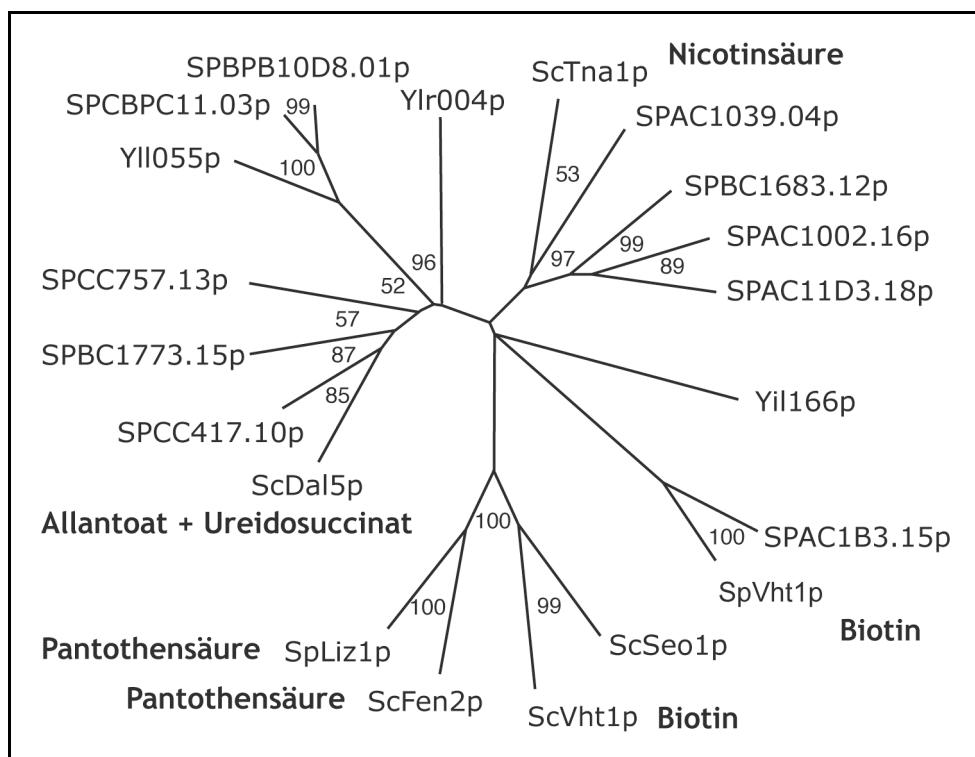


Abb. 1-4: Phylogenetischer Baum der Dal5p Familie. Aus Stolz (2003). Erläuterungen siehe Text.

Für die Aufnahme von Pantothenäsäure über die Plasmamembran sind sowohl in Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) als auch in Spalthefe (*S. pombe*) die Transportproteine bekannt. Zunächst konnte von Marcireau *et al.* (1996) gezeigt werden, dass eine Mutation im *FEN2* Gen zu einem deutlich reduzierten Gehalt an Ergosterol und damit zu einer Resistenz gegen Fenpropiomorph, einem Fungizid, führte. Pantothenäsäure ist eine Vorstufe von Coenzym A, über das die Biosynthese von Ergosterol erfolgt. Fen2p ist ein Mitglied der Gruppe der Dal5-Proteine und es wird vermutet, dass der reduzierte Ergosterolgehalt durch einen Mangel an Pantothenäsäure verursacht ist. Aufgrund dieser Zusammenhänge konnte Fen2p von Stolz und Sauer (1999) als das Plasmamembrantransportprotein für Pantothenäsäure identifiziert werden. Auch bei diesem Protein handelt es sich um ein hochaffines Transportsystem mit einem K_m -

Wert von 3,5 µM, das sensitiv gegenüber Protonophoren ist. Es scheint sich somit auch bei der Aufnahme von Pantothensäure in Bäckerhefe um einen Protonensymport zu handeln. Die Identifizierung des Pantothensäuretransportproteins in Spalthefe erfolgte, wie auch bei Biotin, durch Komplementation der *fen2Δ*-Mutante in Bäckerhefe (Stolz *et al.* 2004). Jedoch wurde hier das zu *FEN2* homologe (siehe Abbildung 1-4) *liz1⁺* Gen kloniert und dessen Komplementation überprüft. Dieses Gen besitzt die größte Homologie zum *FEN2*-Gen aus Bäckerhefe. Es wurde erstmals von Moynihan und Enoch (1999) als ein Membranprotein beschrieben, dessen Deletion unter Zugabe des DNA-Replikationsinhibitors Hydroxyurea (HU) zur Ausbildung eines „cut“ Phänotyps führt. Beim „cut“-Phänotyp findet die Mitose statt, obwohl keine komplette DNA-Replikation erfolgt ist. Dies führt zu Ausbildung von Zellen, die keinen Zellkern oder einen Zellkern mit einem unvollständigen Chromosomensatz haben (Funabiki *et al.* 1996). Des Weiteren wurde gezeigt, dass *liz1Δ*-Mutanten auf Minimalmedium ohne Uracil deutlich schlechter wachsen als der Wildtyp. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Biosynthese von Pantothensäure über Uracil erfolgt und die Menge des internen Uracils nicht für die DNA Replikation und die Herstellung von Pantothensäure ausreicht (Stolz *et al.* 2004). Für den Transport über die Plasmamembran ist für Liz1p ein K_m -Wert von 2,75 µM beschrieben. Auch hier handelt es sich um einen Protonensymporter, der durch Protonophore inhibierbar und durch Glucose stimulierbar ist (Stolz *et al.* 2004).

Als bislang letztes Vitamintransportprotein aus der Familie der Dal5-Proteine in *S. cerevisiae* konnte das für den Nicotinsäuretransporter kodierende Gen beschrieben werden. Llorente und Dujon (2000) und Klebl *et al.* (2000) konnten dieses identifizieren, indem sie die Transkriptionslevel bislang uncharakterisierter Gene dieser Familie nach Anzucht mit bzw. ohne Nicotinsäure verglichen haben. Dies führte zur Identifizierung des *TNA1*-Gens (transport of nicotinic acid 1). Obwohl die Bäckerhefe prototroph für Nicotinsäure ist, konnten sowohl eine Regulation des Transporters, abhängig von der Nicotinsäurekonzentration, als auch der hochaffine Transport mit einem K_m -Wert von 1,7 µM gezeigt werden. Die Identität des *S. pombe* Nicotinsäuretransporters ist bislang nicht geklärt.

Einige der bislang gefundenen Vitamintransportproteine gehören zur Familie der Dal5-Proteine. Die anderen in Hefen bekannten Vitamintransporter gehören jedoch nicht zur Familie der Dal5p verwandten Proteinen.

Obwohl die genannten Hefen prototroph für Pyridoxin sind, konnten Stolz und Vielreicher (2003) das Transportprotein für Pyridoxin in *S. cerevisiae* finden. Pyridoxin ist ein Mitglied der Vitamin B₆-Familie. Die Vitamine dieser Familie unterscheiden sich lediglich in der funktionellen Gruppe. Die Vitamin B₆-Familie besteht aus Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL)

und Pyridoxamin (PM), wobei Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) die aktive Form ist, in welches alle Mitglieder dieser Familie intrazellulär umgewandelt werden können. Zur Identifizierung dieses Transporters wurde ein Stamm, in dem die Pyridoxin-Biosynthesegene *SNZ1* und *SNO1* deletiert waren, mutagenisiert. Anschließend wurde nach Klonen gesucht, die auf niedriger PN-Konzentration nicht mehr wachsen konnten. Diese Klone wurden mit einer Genbank transformiert und nach komplementierenden Genen gesucht. Dies führte zur Identifizierung von *TPN1* (transport of pyridoxine 1) als dem Gen, welches für den Pyridoxintransporter kodiert. Tpn1p ist ein Protein der Purin-Cytosin Permeasefamilie. Es handelt sich um einen hochaffinen Transporter für PN mit einem K_m -Wert von 0,55 μM, allerdings werden auch PL und PM mit geringerer Affinität über dieses Protein in die Zelle transportiert. Der Transport ist durch Protonophoren hemmbar. Dies belegt, dass es sich auch hier um einen Protonensymport handelt. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass auch die Expression dieses Transporters, jedoch nur in der Biosynthesemutante, durch die Menge an verfügbarem PN reguliert ist. Um den PN-Transporter in *S. pombe* zu finden wurde durch Stolz *et al.* (2005) eine *S. cerevisiae* Doppelmutante mit defekter PN-Biosynthese und PN-Transport mit einer *S. pombe* cDNA Genbank transformiert. Nachfolgend wurden Stämme gesucht, die auf niedrigen PN-Konzentrationen wachsen konnten. Dies führte zur Entdeckung von *car1⁺* (changed amiloride resistance 1). Dieses Gen gehört zur Mdrp-Familie (multidrug resistance) und wurde von Stolz *et al.* (2005) zu *bsu1⁺* (B six uptake 1) umbenannt. Bsulp hat mit einem K_m -Wert von 24 μM eine deutlich geringere Affinität zu PN als Tpn1p. Wie bei den bereits beschriebenen Transportern liegt hier auch Protonen–symport vor. Es konnte für *bsu1⁺* gezeigt werden, dass die Expression von der Menge an PN im Medium abhängig ist. Zusätzlich dazu wurde bereits von Niederberger *et al.* (1996) dargestellt, dass die Expression durch Zugabe von Thiamin komplett reprimiert werden kann.

Als letztes soll hier auf den Transport von Thiamin über die Plasmamembran von Hefe eingegangen werden. Sowohl *S. pombe* als auch *S. cerevisiae* sind für Thiamin prototroph, jedoch konnte bei beiden Thiaminaufnahme nachgewiesen werden. In *S. pombe* wurde zwar durch Schweingruber *et al.* (1991) die Aufnahme von Thiamin beschrieben, jedoch konnte das dafür verantwortliche Gen bisher noch nicht gefunden werden. Von Iwashima *et al.* (1975) konnten Stämme isoliert werden, die gegen Pyritthiamin, einem toxischen Thiamin-Analogon, resistent waren und kaum noch Thiaminaufnahme zeigten. Die Identifizierung des Transportproteins für Thiamin in *S. cerevisiae* gelang zwei Gruppen nahezu zeitgleich. Beide Gruppen konnten dieses Gen über die Komplementation eines Pyritthiamin-resistenten Stammes mit einer Genbank finden (Enjo *et al.* 1997; Singleton 1997). Enjo *et al.* (1997) haben einen Pyritthiamin-resistenten Stamm mit einer genomischen DNA-Bank transformiert

und die Zellen auf Medium mit niedrigen Thiaminkonzentrationen ausplattiert. Die Zellen wurden dann auf ihre Thiamintransportaktivität mittels Färbung durch Triphenyltetrazoniumchlorid, welches durch den Thiamintransporter aufgenommen wird, überprüft. Die Kolonien, die Thiamin wieder aufnehmen konnten, zeigten eine rote Färbung. Dies führte zur Identifizierung von *THI10*. Singleton (1997) verwandte zur Suche des Thiamintransporters einen Pyridoxal-resistenten Stamm, dem es durch die Transformation mit einer Genbank möglich war, auch ohne dem Thiaminbiosynthesegens *THI4* auf niedrigen Thiaminkonzentrationen zu wachsen. Mit diesem Ansatz konnte auch dieser Autor das Gen *THI10* (hier *THI7* genannt) finden. Thi10p hat einen K_m -Wert von 0,18 µM und gehört zur *FUR*-Familie (5-Fluorouridine resistant). Andere Proteine der Furp-Familie sind beispielsweise an der Aufnahme von Uracil (Fur4p), von Allantoin (Dal4p) oder von Uridin (Fui1p) beteiligt (Urban-Grimal *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1998; Yoo *et al.* 1992). Wie bereits bei anderen Transportern beschrieben, ist auch die Expression von *THI10* in Abhängigkeit von der Außenkonzentration seines Substrats reguliert.

Alle der hier besprochenen Transportproteine besitzen in Hydropathieanalysen zwölf Transmembrandomänen. Sie sind (mit Ausnahme von Tpn1p (Paulsen *et al.* 1998)) Mitglieder der „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) nach Marger und Saier (1993) und Pao *et al.* (1998).

1.2.2 Riboflavintransport

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erwähnt, sind Säuger und auch weitere Vertebraten auxotroph für Riboflavin. Da es sich bei Riboflavin um ein relativ großes und polares Molekül handelt, muss die Aufnahme in die Zelle durch Transportproteine katalysiert werden. Von Menschen aufgenommenes Riboflavin stammt einerseits aus der Nahrung und andererseits aus der Biosynthese von Bakterien der Darmflora. Riboflavin kommt in der Nahrung sowohl in seiner freien Form, als auch proteingebunden als FMN und FAD vor. Im Folgenden soll die Aufnahme in Vertebraten am Beispiel des Menschen gezeigt werden.

Durch die Magensäure erfolgt eine Hydrolyse, welche die Flavoproteine in Proteine und freies Flavin aufspaltet (McCormick 1989). Während der Absorption im Dünndarm werden FMN und FAD durch unspezifische Phosphatasen der Saumzellen des Dünndarms zu freiem Riboflavin umgesetzt. Nach der Aufnahme des freien Riboflavins über den Dünndarm wird es durch die Enzyme Flavokinase und FAD Synthetase aus dem Cytoplasma wieder zu den Coenzymen FMN und FAD umgesetzt (Gastaldi *et al.* 2000). Der Großteil des aufgenommenen Riboflavins liegt im Blut als FMN und FAD vor (Zempleni *et al.* 1996). Da die Riboflavinaufnahme über den Dünndarm erfolgt, haben Said *et al.* (2000) die

Aufnahmekinetik in der menschlichen Darmepithel Zelllinie NCM460 untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Aufnahme nach einer Sättigungskinetik mit einem K_m -Wert von 0,14 µM erfolgt. Die Aufnahme von Riboflavin ist durch die Strukturanaloga Lumichrom und Lumiflavin und durch die Zugabe von Protonophoren inhibierbar. Es handelt sich hier um einen hochaffinen, energieabhängigen, aktiven Transportvorgang. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transportaktivität durch die Riboflavinkonzentration im Außenmedium reguliert wird. Zellen, die in riboflavinverarmten Medium kultiviert wurden, zeigten im Aufnahmetest eine erhöhte Aufnahme an Riboflavin. Analog dazu war die Aufnahme in Zellen, die in Medien mit Riboflavinüberschuss kultiviert waren, deutlich niedriger. Obwohl der Riboflavintransport in dieser Zelllinie bereits beschrieben wurde, ist das Gen für das Transportprotein noch unbekannt.

Im Gegensatz zu Vertebraten sind Pflanzen und niedere Eukaryonten prototroph für Riboflavin. Es konnte jedoch bei zwei verschiedenen Hefespezies und dem filamentösen Pilz *A. gossypii* Riboflavinaufnahme in Biosynthese-defizienten Stämmen beschrieben werden. Perl *et al.* (1976) beobachteten in einem durch Mutagenese gewonnenen riboflavin-biosynthesedefizienten Stamm von *S. cerevisiae* eine Riboflavinaufnahme. In Stämmen mit intakter Biosynthese konnte kein Import gezeigt werden. Die Aufnahme von Riboflavin nahm in anaerob kultivierten Stämmen gegenüber der von aerob kultivierten Stämmen stark zu. Ebenso war eine starke Abhängigkeit der Aufnahmerate von der Riboflavinkonzentration im Medium zu sehen. Je geringer die Konzentration im Kultivierungsmedium war, desto höher war die Aufnahmerate der Zellen. Der Transport zeigte eine Sättigungskinetik und einem K_m -Wert von 15 µM. Der Import von Riboflavin kann durch eine Energetisierung mittels Glucose nicht stimuliert werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um keinen aktiven Transport, sondern um eine erleichterte Diffusion handelt. Im Gegensatz zum menschlichen Riboflavintransport konnte für Bäckerhefe gezeigt werden, dass über den Zeitraum des Aufnahmetests nur ein geringer Teil des importierten Riboflavins zu FMN oder FAD umgewandelt wurde. Des Weiteren wird vermutet, dass intrazelluläres Flavin die Expression des Transporters reprimiert.

Von Sibirnyi *et al.* (1977) wurde beschrieben, dass *Pichia guillermondii* (*P. guillermondii*) Riboflavin über die Plasmamembran transportieren kann. Sie konnten durch Mutagenese einen riboflavinauxotrophen Stamm isolieren, der trotz eines Biosynthesedefekts auf einer niedrigen Riboflavinkonzentration wachsen konnte. Sie ermittelten für diesen Transportprozess einen K_m -Wert von 170 µM. Bei diesem Riboflavintransportprotein scheint es sich um einen aktiven Transport zu handeln, da die Zellen Riboflavin in großen Mengen akkumulierten und die Aufnahme zusätzlich durch Protonophoren inhibierbar war.

Bei dem dritten fungalen Organismus, in dem bislang ein Import von Riboflavin beschrieben wurde, handelt es sich um den filamentösen Pilz *A. gossypii*. Hier konnte von Förster *et al.* (2001) in einer *RIB5* Deletionsmutante ein spezifischer Transport mit geringer Aktivität gemessen werden. Diese Aufnahme zeigte einen K_m -Wert von 40 µM und war, wie die in *P. guillerimondii*, zwar durch Protonophoren inhibierbar aber durch Glucosezugabe nicht stimulierbar. Im Gegensatz zu den Proteinen aus *S. cerevisiae* und *P. guillerimondii* konnte für das in *A. gossypii* gezeigt werden, dass auch FMN bzw. FAD um den Import mit Riboflavin konkurrieren. Zusammenfassend ist über all diese Transportvorgänge zu sagen, dass der Import von Riboflavin nur in Biosynthesemutanten messbar und nicht durch Glucose stimulierbar war. Bis jetzt konnte in keinem eukaryontischen Organismus das Gen für den Riboflavintransport identifiziert werden.

In prokaryontischen Organismen wurde die Riboflavinaufnahme bislang nur in *B. subtilis* eingehend untersucht. Cecchini *et al.* (1979) zeigten, dass der Import von Riboflavin sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in Riboflavinbiosynthesemutanten messbar ist. Jedoch ist die Transportrate in Biosynthesemutanten sechs bis siebenfach höher als im Wildtyp. Es konnte gezeigt werden, dass Wildtypstämme Riboflavin zehnfach akkumulieren konnten. Jedoch wird das von der Biosynthesemutante aufgenommene Riboflavin, ähnlich wie beim Menschen, rasch zu FMN und FAD umgesetzt. Die Aufnahmekapazität im pH-Bereich von 5,5 bis 8,5 variierte nicht. Da die Aufnahme sehr rasch erfolgt, konnte kein exakter K_m -Wert ermittelt werden, er liegt aber zwischen 5 und 20 nM. Die Aufnahmekapazität konnte durch Protonophoren inhibiert und durch Glucosezugabe stimuliert werden. Es ist jedoch unklar, ob die Energetisierung für den Transport oder die darauf folgende Phosphorylierung nötig ist. Einige Riboflavinanaloga konkurrieren mit Riboflavin um die Aufnahme, jedoch nicht FMN und FAD.

In grampositiven Bakterien konnte von Gelfand *et al.* (1999) ein konserviertes RNA-Strukturelement gefunden werden, das an der Regulation der Expression der Riboflavin-biosynthesegene beteiligt ist. Es wurde als RFN-Element benannt und reguliert die Transkription der Biosynthesegene. Der Mechanismus beruht darauf, dass freies FMN an das RFN-Element der mRNA bindet, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Freies FMN akkumuliert, wenn alle Apoproteine mit den entsprechenden Cofaktoren gesättigt sind. Durch diese Änderung der Konformation kommt es bei den Genen des Biosyntheseoperons zu einer frühzeitigen Termination der Transkription. Neben den Riboflavinbiosynthesegenen konnte auch im Promotor des *B. subtilis ypaA*-Gens ein RFN-Element gefunden werden was zu der Vermutung führte, dass YpaA am Import von Riboflavin beteiligt sein könnte. Im Gegensatz zu den Genen des Biosyntheseoperons erfolgt bei *ypaA* trotz der Bindung von

FMN ans RFN-Element die Transkription. Die Bindung von FMN an das RFN-Element führt jedoch zu einer Konformationsänderung der mRNA, wodurch die Shine-Dalgarno-Sequenz blockiert wird, das Ribosom deshalb nicht binden kann und keine Translation der mRNA erfolgt (Vitreschak *et al.* 2002). Durch Hydropathieanalyse von YpaA konnte gezeigt werden, dass dieses Protein fünf Transmembrandomänen besitzt. Kreneva *et al.* (2000) haben beschrieben, dass *ypaA*- und Riboflavinbiosynthese-Doppelmutanten eine deutlich höhere Konzentration an Riboflavin im Medium brauchen als Biosyntheseeinzelmutanten und deutlich weniger Flavine akkumulieren. Durch parallel zu dieser Dissertation durchgeführte Experimente konnten C. Vogl und J. Stolz YpaA als das Riboflavintransportprotein aus *B. subtilis* identifizieren (unveröffentlichte Daten).

Von Burgess *et al.* (2006) wurde beschrieben, dass das YpaA homologe aus *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) RibU die Aufnahme von Riboflavin katalysiert. *ribU* hat ebenso wie *ypaA* ein RFN-Element, jedoch erfolgt die Regulation der Expression nicht auf der Ebene der Translation, sondern wie beim Riboflavinbiosynthese-Operon in *B. subtilis* bereits auf der Transkriptionsebene.

1.3 Wahrnehmung von Substraten in *S. cerevisiae* und Regulation der Transportproteine

Wie bereits bei einigen Vitaminen (in den Kapiteln 1.2.1 und 1.2.2) beschrieben, konnte für eine Vielzahl von Transportproteinen gezeigt werden, dass die Expression dieser Proteine durch die Verfügbarkeit der jeweiligen Substrate reguliert wird. Im Folgenden sollen einige Beispiele für die Mechanismen der Wahrnehmung von Substraten und eine daraus resultierende Expressionsregulation der Transportproteine gezeigt werden.

1.3.1 Wahrnehmung von Glucose

Obwohl Bäckerhefe zahlreiche Substrate als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann, ist Glucose die bevorzugte Quelle. Der erste und limitierende Schritt im Glucosemetabolismus ist der Transport über die Plasmamembran. In *S. cerevisiae* gibt es zwanzig Gene, die für Proteine mit großer Ähnlichkeit zu Glucosetransportern kodieren (Bisson *et al.* 1993). Diese Gruppe besteht aus den *HXT1-HXT17*-Genen (hexose transporter 1-17), *GAL2* (galactose permease 2), *SNF3* (sucrose non fermenting 3) und *RGT2* (restores glucose transport 2). Bei den durch die *HXT*-Gene kodierten Proteinen konnte nur für Hxt1p bis Hxt7p gezeigt werden, dass sie tatsächlich Glucose transportieren. Die Deletion einzelner *HXT*-Gene führt nicht

dazu, dass die Zellen Glucose nicht mehr verwerten können. Erst die siebenfache Mutante der *HXT* Gene 1-7, die *hxt*-Nullmutante bezeichnet wird, führt zu einem Glucosewachstumsphänotyp (Boles und Hollenberg 1997).

In *S. cerevisiae* wurden zwei unterschiedliche Aufnahmesysteme beschrieben. Ein System ist konstitutiv exprimiert und zeigt eine niedrige Affinität mit einem hohen K_m -Wert von 15 bis 20 mM, während das zweite durch Glucose reprimiert wird und eine hohe Affinität mit einem niedrigen K_m -Wert von 1 bis 2 mM zeigt (Bisson 1988). Reifenberger *et al.* (1997) konnten durch Expression der einzelnen *HXT* Gene in der *hxt*-Nullmutante darstellen, welche der durch die jeweiligen Gene kodierten Transportproteine hochaffin und welche niedrigaffin sind. Sie bewiesen, dass die Überexpression von Hxt2p, Hxt6p oder Hxt7p in der *hxt*-Nullmutante bereits Wachstum auf 0,1 % Glucose ermöglichen (hochaffine Transporter) während die Überexpression von Hxt1p, Hxt3p, Hxt4p oder Hxt5p (niedrigaffine Transporter) das Wachstum erst ab 1 % Glucose ermöglichen. Ozcan und Johnston (1995) konnten durch *lacZ*-Fusionen mit den jeweiligen Promotoren zeigen, dass die Expression von verschiedenen *HXT*-Genen durch unterschiedliche Glucosekonzentrationen reguliert ist. Es erfolgt jedoch keine Expression dieser Gene in Abwesenheit von Glucose (siehe Abbildung 1-5).

Die glucoseabhängige Regulation dieser Genexpressionen zeigt, dass Zellen in der Lage sein müssen, extrazelluläre Glucosekonzentrationen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Das Ansprechverhalten der *HXT*-Gene auf verschiedene Glucosekonzentrationen ist jedoch unterschiedlich. Bei den vier in Abbildung 1-5 genannten Genen konnten drei unterschiedliche Regulationarten dargestellt werden. Während an der Expression von *HXT1* zu sehen ist, dass dessen Expression mit steigender Glucosekonzentration zunimmt, ist *HXT3* bei Anwesenheit von Glucose exprimiert. Bei *HXT2* und *HXT4* ist zu sehen, dass sie in niedrigen Glucosekonzentrationen stark exprimiert werden, während die Expression in hohen Glucosekonzentrationen stark reprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Bäckerhefe ein Mechanismus zur Wahrnehmung der Glucosekonzentration vorhanden sein muss. Da die in Abbildung 1-5 gezeigten *HXT*-Gene alle Arten der Regulation durch Glucose abdecken, wird im Folgenden nur auf die Regulation dieser Gene eingegangen.

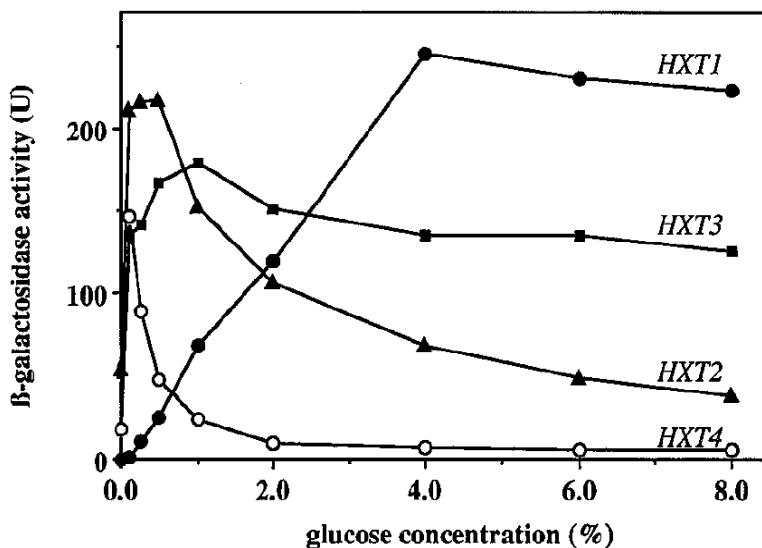


Abb. 1-5: Induktion der *HXT* Genexpression als Funktion der extrazellulären Glucose-konzentration. Die Vorkultur der Zellen wurden in SDGal-Medium kultiviert und dann in SDGal-Medium mit Zusatz von verschiedenen Glucosekonzentrationen überimpft. Die Zellen, mit *lacZ*-Reporterkonstrukten, wurden für 3 Stunden kultiviert und dann die β -Galactosidaseaktivität der jeweiligen Kulturen bestimmt. Aus Özcan und Johnston (1995).

Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer Mutation im *SNF3*-Gen auf Medium mit einer niedrigen Glucosekonzentration nicht wachsen können (Bisson *et al.* 1987). Die Autoren vermuteten, dass es sich bei Snf3p um ein hochaffines Glucosetransportprotein handelt, da für dieses Protein zwölf Transmembrandomänen vorhergesagt werden und es große Homologie zu den *HXT*-Genen aufweist. Allerdings konnte weder durch Snf3p noch durch das homologe Rgt2p eine Glucoseaufnahme nachgewiesen werden. Özcan *et al.* (1996) konnten jedoch aufgeklären, dass es sich bei den Hxtp-Homologen Snf3p und Rgt2p um Proteine handelt, die für die Wahrnehmung der extrazellulären Glucosekonzentration verantwortlich sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Sensoren in der Plasmamembran, die jedoch selbst keine Glucose transportieren. Snf3p ist der Sensor für niedrige extrazelluläre Glucosekonzentrationen und reguliert die Expression der hochaffinen Glucosetransporter. Rgt2p registriert hohe Glucosekonzentrationen und führt zur Expression der niedrigaffinen Transporter. Abbildung 1-6 liefert einen Überblick über die Regulation der Glucosetransporter.

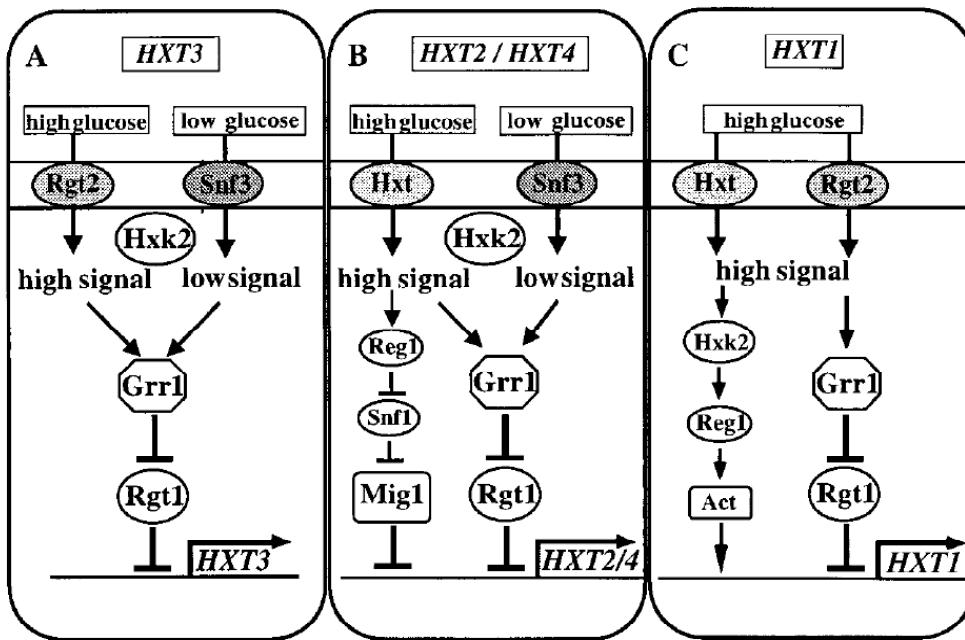


Abb. 1-6: Drei verschiedene Induktionsarten der *HXT*-Gentranskription durch unterschiedliche Glucosekonzentrationen. Aus Özcan und Johnston (1999). Erläuterungen siehe Text.

Neben Rgt2p und Snf3p, den Proteinen zur Wahrnehmung der extrazellulären Glucosekonzentration, sind weitere Proteine an der Expressionsregulation der untersuchten *HXT*-Gene beteiligt. Rgt1p (restores glucose transport 1) reprimiert in Abwesenheit von Glucose die Transkription, während dieser reprimierende Effekt in Anwesenheit von Glucose unterdrückt wird (Ozcan *et al.* 1996). Die Repressorfunktion von Rgt1p wird in Anwesenheit von Glucose durch eine Inhibierung der Repression über Grr1p (glucose repression resistant 1) unterdrückt. Es wird vermutet, dass Grr1p die Expression der *HXT*-Gene über die Ubiquitin-Proteolyse-Maschinerie reguliert (Li und Johnston 1997). Die Aktivierung von Grr1p scheint durch die Signale von Snf3p und Rgt2p zu erfolgen und führt zur Transkription der *HXT*-Gene. Bei den Proteinen Grr1p, Rgt1p, Reg1p und Snf1p handelt es sich um Proteine der Signalkette zur Wahrnehmung von Glucose. Die Induktion der Transkription von *HXT3* erfolgt durch Glucose, ist jedoch unabhängig von der vorhandenen Glucosekonzentration (siehe Abbildung 1-6A). Die Transkription der Gene *HXT2* und *HXT4* wird bei einer hohen extrazellulären Glucosekonzentration und bei Abwesenheit von Glucose reprimiert (siehe Abbildung 1-6B). Die Transkriptionsrepression in Abwesenheit von Glucose erfolgt wie bei *HXT3* über Rgt1p. Zusätzlich zu Rgt1p besitzen diese Promotoren eine weitere Repressorbindestelle für Mig1p (multicopy inhibitor of GAL gene expression 1). Bei einer hohen Glucosekonzentration bindet Mig1p an den Promotor und verhindert die Transkription der Gene, während bei einer niedrigen Konzentration die Transkription wie bei *HXT3* beschrieben stattfindet. Bei der Transkriptionsaktivierung von *HXT1* durch hohe Glucosekonzentrationen

muss es neben der Regulation über Rgt1p noch einen weiteren Mechanismus zur Aktivierung geben (siehe Abbildung 1-6C). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *HXT1* (auch in Abwesenheit von Rgt1p) durch hohe Glucose-konzentrationen induzierbar ist (Ozcan und Johnston 1995). Dieser Mechanismus ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Die Wahrnehmung der unterschiedlichen extrazellulären Glucosekonzentrationen erfolgt hauptsächlich über die Proteine Snf3p und Rgt2p aus der Familie der Hexosetransportproteine. Die Expression von hoch- bzw. niederaffinen Proteinen für die Aufnahme von Glucose erfolgt in Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit.

1.3.2 Wahrnehmung von Phosphat

Im Gegensatz zu Glucose ist anorganisches Phosphat ein essentieller Faktor für das Wachstum von *S. cerevisiae*. Zellen benötigen anorganisches Phosphat in millimolaren Mengen, beispielsweise zur Synthese von Nukleinsäuren, Phospholipiden und zellulären Metaboliten. Da in der Umwelt meist deutlich niedrigere Konzentrationen vorliegen als von den Zellen benötigt, muss anorganisches Phosphat über Plasmamembrantransporter aufgenommen und akkumuliert werden.

Tamai *et al.* (1985) haben beschrieben, dass es in Bäckerhefe für die Aufnahme von anorganischem Phosphat (ebenso wie für Glucose) ein hoch- und ein niederaffines Transportsystem gibt. Das eine System hat einen K_m -Wert von 8,2 μM und das andere einen K_m -Wert von 770 μM . Es konnten zwei hochaffine Transportproteine, Pho84p und Pho89p (phosphate metabolism) identifiziert werden, wobei Pho89p unter physiologischen Bedingungen nahezu inaktiv zu sein scheint (Persson *et al.* 1999). Für den niedrigaffinen Transport bei mehr als 2 mM extrazellulären anorganischem Phosphat sind die Proteine Pho87p, Pho90p und Pho91p verantwortlich (Wykoff und O'Shea 2001). Die niedrigaffinen Transportproteine sind konstitutiv und somit unabhängig vom vorhandenen anorganischem Phosphat exprimiert, während die Expression von *PHO84* stark durch die extrazelluläre Phosphatkonzentration reguliert wird (Bun-Ya *et al.* 1991). Die Wahrnehmung der Phosphatkonzentration und somit die Expressionsregulation von *PHO84* kann über drei Wege erfolgen (Mouillon und Persson 2006). Bei einer niedrigen Phosphat-Außenkonzentration kommt es im Cytosol der Zelle zu einem niedrigen Phosphatspiegel. Dieser Zustand wird wahrgenommen und führt, wie in Abbildung 1-7 dargestellt, zu einer Aktivierung des *PHO*-Signalwegs.

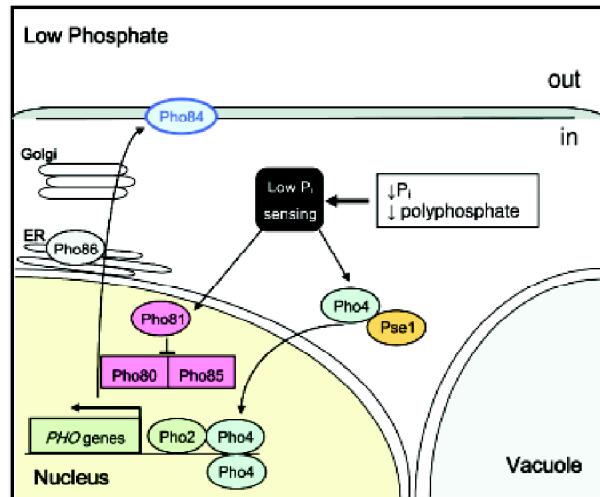
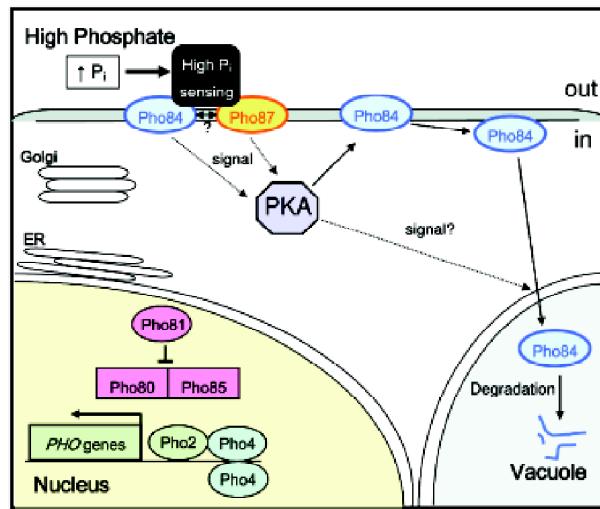


Abb. 1-7: Mechanismus der Wahrnehmung von niedrigen Phosphatkonzentrationen in *S. cerevisiae*. Aus Mouillon und Persson (2006). Erläuterungen siehe Text.

Der *PHO*-Signalweg vermittelt die Phosphat-Antwort über die Kontrolle der Aktivität und Lokalisation des Transkriptionsfaktors Pho4p über dessen Phosphorylierung durch den Cyclin-abhängigen Kinasekomplex (CDK) Pho80p-Pho85p (Toh-e *et al.* 1988). Wenn die Zellen an Phosphat verarmt sind, inaktiviert der CDK-Inhibitor Pho81p den Pho80p-Pho85p-Komplex, wodurch Pho4p unphosphoryliert bleibt. Das unphosphorylierte Pho4p bindet an den Zellkernimportrezeptor Pse1p und tritt in den Zellkern ein, wo es die Expression von *PHO84* induziert. Es wird vermutet, dass ein metabolisches Signal im Inneren der Zelle die Antwort auf eine Phosphatverarmung reguliert (Wykoff und O'Shea 2001). Für die Wahrnehmung von einer hohen Konzentration an extrazellulärem Phosphat gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Zellen, die in einer niedrigen Konzentration an Phosphat angezogen und in eine hohe Konzentration überimpft wurden, zeigen eine rasche Degradation der vorhandenen Pho84p Proteine. Der dieser schnellen Antwort zugrunde liegende Mechanismus ist in Abbildung 1-8 dargestellt. Es konnte jedoch von Pinson *et al.* (2004) gezeigt werden, dass die niedrigaffinen Transportproteine Pho87p, Pho90p und Pho91p an der Phosphatwahrnehmung beteiligt sind. Durch ein Signal der Sensoren wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche durch Phosphorylierung von Pho84p zur Deaktivierung des Transporters und anschließend zur Degradation in der Vakuole führt.

Neben dieser schnellen Antwort auf eine hohe Verfügbarkeit an Phosphat erfolgt im Anschluss an die Degradation eine langfristige Regulation von Pho84p (wie generell bei einer hohen Außenkonzentration an Phosphat). Diese Regulation wird durch die Wahrnehmung einer hohen Phosphatkonzentration im Inneren der Zelle ausgelöst (Auesukaree *et al.* 2004).

Abb. 1-8: Mechanismus zur schnellen Wahrnehmung von hohen Phosphatkonzentrationen im Medium in *S. cerevisiae*. Aus Mouillon und Persson (2006). Erläuterungen siehe Text.



Der CDK-Inhibitor Pho81p wird inaktiviert, wodurch der Pho80p-Pho85p Komplex aktiv wird und Pho4p phosphoryliert. Das phosphorylierte Pho4p wird an den Zellkernexportrezeptor Msn5p gebunden und aus dem Zellkern exportiert. Ohne die Aktivierung durch Pho4p wird somit kein neues Pho84p mehr gebildet.

Im Gegensatz zur Wahrnehmung von Glucose findet die Wahrnehmung für Phosphat sowohl durch die niedrigaffinen Transportproteine im extrazellulären Medium, wie auch durch noch nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen im Inneren der Zelle statt.

1.3.3 Wahrnehmung von Thiamin

Ein weiteres wichtiges Substrat im Stoffwechsel ist Thiamin. Es sind drei Enzymgruppen bekannt (Pyruvatdecarboxylasen, Transketolasen und Dehydrogenasen), die Thiamin in Form des Cofaktors Thiaminpyrophosphats (Thiamindiphosphat, ThDP) benötigen (Hohmann und Meacock 1998). Die Umsetzung von Thiamin zu ThDP erfolgt über Thi80p (Nosaka *et al.* 1993). Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben kann *S. cerevisiae* Thiamin durch das Transportprotein Thi10p aufnehmen. Sowohl die Expression der bekannten Thiaminbiosynthesegene (*THI4*, *THI5*, und *THI6*) als auch das Thiamin zu ThDP umsetzende Gen (*THI80*) wird in Medien mit Thiamin deutlich reprimiert (Nosaka *et al.* 1993; Nosaka *et al.* 1994; Praekelt *et al.* 1994; Wightman und Meacock 2003). Ebenso wie die Biosynthese ist auch die Expression von *THI10* durch hohe Thiaminkonzentrationen im Medium reprimiert (Singleton 1997). Dies lässt darauf schließen, dass Bäckerhefe in der Lage sein muss, die Thiaminkonzentration wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Die Expression der an der Biosynthese beteiligten Gene wird durch die Transkriptionsaktivatoren Thi2p (zunächst von

Kawasaki *et al.* (1990) Pho6p genannt) und Thi3p reguliert (Nishimura *et al.* 1992; Nishimura *et al.* 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *THI2* bei einer niedrigen Thiaminkonzentration zu einer reduzierten Expression der Thiaminbiosynthesegene führt, während *THI10* normal exprimiert wird. Im Gegensatz zur *thi2Δ*-Mutante werden in einer *THI3*-Deletionsmutante weder die Biosynthesegene noch das Transporter-Gen stärker exprimiert. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Thi3p der globale Regulator der Thiamin-Genexpression ist. Im Gegensatz zur *thi2Δ*- und *thi3Δ*-Mutante unterbindet eine Mutation im *THI80*-Gen die Repression durch Thiamin. In Letzterer liegt ein erniedriger Gehalt an ThDP vor, während Thiamin intrazellulär akkumuliert wird. Anhand dieser Ergebnisse wurde schon länger vermutet, dass nicht das intrazellulär vorliegende Thiamin, sondern ThDP der negative Regulator der Expression sein muss. Der Regulator Thi3p zeigt starke Homologie zu den ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylasen Pdc1p, Pdc5p und Pdc6p. Dies führte zu der Annahme, dass Thi3p ebenfalls in direkter Verbindung zu ThDP steht (Hohmann und Meacock 1998). Nosaka *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Thi3p ThDP bindet und dass diese Bindung für die Repression benötigt wird. Thi3p ist sowohl ein positiver Regulator der thiaminabhängigen Gene als auch ein Sensor für ThDP. Die Bindung von ThDP an Thi3p führt zu einer Konformationsänderung, wodurch der aktivierende Thi2p-Thi3p-Komplex nicht mehr ausgebildet werden kann.

Am Beispiel von Thiamin konnte gezeigt werden, dass die Wahrnehmung von Thiamin direkt im Inneren der Zelle aufgrund der Bindung des Substrats an den Transkriptionsfaktor stattfindet.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits einige der unter Kapitel 1.2.1 beschriebenen Vitamintransportproteine in *S. cerevisiae* und *S. pombe* identifiziert werden.

Obwohl fast alle bekannten Hefen riboflavinprototroph sind, konnte von Perl *et al.* (1976) in Bäckerhefestämmen mit einer Mutation in der Riboflavinbiosynthese der Import von Riboflavin gezeigt werden. Ebenso wurde von Förster *et al.* (2001) der Riboflavinimport in Biosynthesemutanten von *A. gossypii* und von Sibirnyi *et al.* (1977) in *P. guillermondii* gezeigt. Jedoch wurde in keiner dieser Arbeiten das für den Transport verantwortliche Gen identifiziert. Zu diesem Zweck sollte der Organismus *S. cerevisiae* untersucht werden, der Riboflavin zwar synthetisieren kann, für den aber in früheren Arbeiten Transport von Riboflavin nachgewiesen wurde. Das Ziel dieser Arbeit war es zunächst, das Gen zu finden, welches für das Riboflavintransportprotein kodiert. Die kinetischen Konstanten dieses Proteins sollten daraufhin charakterisiert werden, um zu sehen ob sie mit den von Perl *et al.* (1976) beschriebenen Daten übereinstimmen. Weiterhin sollte versucht werden, anhand des Riboflavintransporters aus *S. cerevisiae* mögliche Rückschlüsse auf den Transport in höheren Eukaryonten wie beispielsweise bei Menschen zu ziehen.

Von Perl *et al.* (1976) wurde bereits vermutet, dass die Expression des Riboflavintransporters in Bäckerhefe durch die intrazelluläre Riboflavinverfügbarkeit beeinflusst wird. Im Verlauf der Arbeit sollte in Biosynthesemutanten geprüft werden, ob die Expression des Gens für das Riboflavintransportprotein tatsächlich in Abhängigkeit von der Riboflavinkonzentration im Medium reguliert wird. Dies führte zu der Zielsetzung, den Mechanismus zur Wahrnehmung von Riboflavin aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

E. coli Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , λ, endA1, hsdR1(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, deoR, Φ80dlacZΔM15	(Hanahan 1983)
XL1-blue	F ⁻ , recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (tet ^r)	Stratagene
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB- mB-), gal, dcm (DE3)	Novagen

S. cerevisiae Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4741	Mat a, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, met15Δ0	(Brachmann <i>et al.</i> 1998), EUOSCARF
BY4742	Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0	(Brachmann <i>et al.</i> 1998), EUOSCARF
CEN.PK 113-13D	Mat α, ura3-52, MAL2-8, SUC2	(Makuc <i>et al.</i> 2001)
mch1Δ	BY4742, Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, mch1Δ::kanMX	EUOSCARF
mch2Δ	BY4742, Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, mch2Δ::kanMX	EUOSCARF
mch3Δ	BY4742, Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, mch3Δ::kanMX	EUOSCARF
mch4Δ	BY4742, Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, mch4Δ::kanMX	EUOSCARF
mch5Δ	BY4742, Mat α, ura3Δ0, leu2Δ0, his3Δ1, lys2Δ0, mch5Δ::kanMX	EUOSCARF
RIB2/rib2Δ	BY4743, Mat a /Mat α, ura3Δ0/ ura3Δ0, leu2Δ0/ leu2Δ0, his3Δ1/ his3Δ1, LYS2/ lys2Δ0, met15Δ0/ MET15, RIB2/rib2Δ::kanMX	EUOSCARF
RIB3/rib3Δ	BY4743, Mat a /Mat α, ura3Δ0/ ura3Δ0, leu2Δ0/ leu2Δ0, his3Δ1/ his3Δ1, LYS2/ lys2Δ0, met15Δ0/ MET15, RIB3/rib3Δ::kanMX	EUOSCARF

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>RIB5/ rib5Δ</i>	BY4743, Mat α /Mat α , <i>ura3Δ0/ ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0/ leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1/ his3Δ1</i> , <i>LYS2/ lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0/ MET15</i> , <i>RIB5/ rib5Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>RIB7/ rib7Δ</i>	BY4743, Mat α /Mat α , <i>ura3Δ0/ ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0/ leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1/ his3Δ1</i> , <i>LYS2/ lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0/ MET15</i> , <i>RIB7/ rib7Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>rib2Δ</i>	aus BY4743, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib2Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>rib3Δ</i>	aus BY4743, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib3Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>rib4Δ</i>	aus BY4743, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib4Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib5Δ::his5⁺</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib7Δ</i>	aus BY4743, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>rib7Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>rib4Δ mch5Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib4Δ::HIS3 mch5Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ mch1Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib5Δ::his5⁺</i> , <i>mch1Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ mch2Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib5Δ::his5⁺</i> , <i>mch2Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ mch3Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib4Δ::his5⁺</i> , <i>mch3Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ mch4Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib5Δ:: his5⁺</i> , <i>mch4Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ mch5Δ</i>	BY4742, Mat α , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>rib5Δ:: his5⁺</i> , <i>mch5Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>rib5Δ</i>	CEN.PK 113-13D, Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>MAL2-8</i> , <i>SUC2</i> , <i>rib5Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>mch1Δ mch2Δ</i> <i>mch3Δ mch4Δ</i> <i>mch5Δ</i>	CEN.PK 113-13D, Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>MAL2-8</i> , <i>SUC2</i> , <i>mch1Δ::loxP</i> , <i>mch2Δ::loxP</i> , <i>mch3Δ::loxP</i> , <i>mch4Δ::loxP</i> , <i>mch5Δ::loxP</i>	(Makuc <i>et al.</i> 2001)
<i>rib5Δ mch1Δ</i> <i>mch2Δ mch3Δ</i> <i>mch4Δ mch5Δ</i>	CEN.PK 113-13D, Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>MAL2-8</i> , <i>SUC2</i> , <i>rib5Δ::kanMX</i> , <i>mch1Δ::loxP</i> , <i>mch2Δ::loxP</i> , <i>mch3Δ::loxP</i> , <i>mch4Δ::loxP</i> , <i>mch5Δ::loxP</i>	(Reihl und Stolz 2005)
MB758-5B	Mat a , <i>ura3-52</i>	(Des Etages <i>et al.</i> 2001)
C74-6D	Mat a , <i>ura3-52</i> , <i>his4-42</i> , <i>PUT3c-683</i>	(Des Etages <i>et al.</i> 2001)
<i>put1Δ</i>	BY4741, Mat a , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>put1Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>put2Δ</i>	BY4741, Mat a , <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>put2Δ::kanMX</i>	EUROSCARF

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>put3Δ</i>	BY4741, Mat a, <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>put3Δ::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>rib5Δ put3Δ</i>	BY4741, Mat a, <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>rib5Δ::his5⁺</i> , <i>put3Δ::kanMX</i>	(Reihl und Stolz 2005)
<i>GAL1prom-FAD1</i>	BY4741, Mat a, <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>GAL1prom-FAD1</i>	diese Arbeit

S. pombe Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
FY254	<i>h⁻</i> , <i>ura4-D18</i> , <i>leu1-3</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>his3-D1</i>	(Liang <i>et al.</i> 1999)

2.1.2 Plasmide

E. coli Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pBluescript	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pPCR-Script Amp SK(+)	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pUC 19	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZ</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
pCH1	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZα</i> , pUC19-Derivat, nur <i>NotI</i> -Schnittstelle zum Klonieren enthalten	C. Hümmer, Erlangen
Litmus 28	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZα</i>	New England Biolabs
pFA6a-kanMX4	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , Transposon <i>Tn903 kan^R</i>	(Wach <i>et al.</i> 1994)
pFA6a-HIS3MX	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>S. pombe his5⁺</i>	(Wach <i>et al.</i> 1994)
pMAL-c2x	<i>ori</i> , <i>amp^R</i> , <i>lacZα</i> , <i>malE</i>	(di Guan <i>et al.</i> 1988)
Litmus 28-rib4::HIS3	<i>RIB4</i> -920 bp bis + 183 bp; + 354 bp bis +2427 bp, + 184 bp bis + 353 in <i>BamHI/SalI</i> ersetzt durch <i>HIS3 BamHI/XhoI</i> Fragment, über <i>BglII/XbaI</i> in Litmus 28 kloniert	diese Arbeit (siehe Disruptionskonstrukte)*
pCH1-rib5::kanMX	<i>RIB5</i> -121 bp bis -1 bp; +719 bp bis +1149 bp, ORF ersetzt durch kanMX, über <i>NotI</i> in pCH1 kloniert	diese Arbeit (siehe Disruptionskonstrukte)*
pCH1-rib5::HIS3MX	<i>RIB5</i> -121 bp bis -1 bp; +719 bp bis +1149 bp, ORF ersetzt durch HIS3MX, über <i>NotI</i> in pCH1 kloniert	diese Arbeit (siehe Disruptionskonstrukte)*
pBS-mch5::URA3	<i>MCH5</i> -687 bp bis -202 bp; +1595 bp bis +1780 bp, -202 bp bis +1595 in <i>BglII</i> ersetzt durch <i>URA3 BamHI/BamHI</i> Fragment, über <i>EcoRI/SalI</i> in pBluescript kloniert	diese Arbeit (siehe Disruptionskonstrukte)*
pMAL-c2x-MCH5	<i>MCH5 PstI/BamHI</i> Fragment +7 bp bis +319 bp kloniert in pMal-c2x	diese Arbeit (siehe pMAL-Konstrukte)*
pMAL-c2x-PUT1	<i>PUT1 BamHI/EcoRI</i> Fragment +46 bp bis +1432 bp in pMAL-c2x	diese Arbeit (siehe pMAL-Konstrukte)*

E. coli – S. cerevisiae Shuttle-Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
YEp352	<i>ori, amp^R, lacZ, 2μ, URA3</i>	(Hill <i>et al.</i> 1986)
pRS426	<i>ori, amp^R, lacZ, 2μ, URA3</i>	(Christianson <i>et al.</i> 1992)
pYES2	<i>ori, amp^R, lacZ, 2μ, URA3, GAL1-Promotor, CYC1-Terminator</i>	Invitrogen
pRS316	<i>ori, amp^R, lacZ, CEN, URA3</i>	(Sikorski und Hieter 1989)
p426-TDH	<i>ori, amp^R, lacZ, 2μ, URA3, TDH3-Promotor, CYC1-Terminator</i>	(Mumberg <i>et al.</i> 1995)
YCplac33	<i>ori, amp^R, CEN, URA3</i>	(Gietz und Sugino 1988)
YEplac195	<i>ori, amp^R, 2μ, URA3</i>	(Gietz und Sugino 1988)
YEplac196	<i>ori, amp^R, 2μ, URA3</i>	(Gietz und Sugino 1988)
YEplac195-GFP	YEplac195, GFP hinter Polylinker	J. Stolz, Regensburg
YEplac196-GAL1prom-GFP	YEplac196, GFP unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors	diese Arbeit (siehe N-terminal markierte <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
YEplac196-GAL1prom-9myc	YEplac196, 9myc unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors	diese Arbeit (siehe N-terminal markierte <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
YCplac33-vp8-lacZ	<i>VHT1</i> -Promotor vor <i>lacZ</i> (aus <i>E. coli</i>)	(Pirner und Stolz 2006)
YEp352-Genbank	Chromosomal DNA wurde aus dem Stamm 45-C3 isoliert und mit Sau3A teilverdaut. DNA Fragmente zwischen 4 and 10 kb wurden auf einem Agarosegel getrennt und in den Vektor YEp352 kloniert.	(te Heesen <i>et al.</i> 1993)
pRS426-MCH5	<i>MCH5 SalI/EcoRI</i> Fragment bp -687 bis +1774 in pRS426 kloniert	(Reihl und Stolz 2005)
pRS426-YOR305w	<i>YOR305w BglII/SalI</i> (aus Polylinker) Fragment bp - 612 bis + 818 in pRS426 kloniert	(Reihl und Stolz 2005)
pYES-MCH1	<i>MCH1 EcoRI/XbaI</i> Fragment bp +1 bis +1457 bp in pYES2	diese Arbeit (siehe pYES-Konstrukte)*
pYES-MCH2	<i>MCH2 EcoRI/XbaI</i> Fragment bp +1 bis +1502 bp in pYES2	diese Arbeit (siehe pYES-Konstrukte)*
pYES-MCH3	<i>MCH3 SpeI/NotI</i> Fragment bp +1 bis +2019 bp in pYES2	diese Arbeit (siehe pYES-Konstrukte)*
pYES-MCH4	<i>MCH4 EcoRI/XbaI</i> Fragment bp +1 bis +1502 bp in pYES2	diese Arbeit (siehe pYES-Konstrukte)*
pYES-MCH5	<i>MCH5 BamHI/BamHI</i> Fragment bp +1 bis +1566 bp in pYES2	diese Arbeit (siehe pYES-Konstrukte)*

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
YEplac195-MCH5-GFP	<i>MCH5</i> <i>PstI/MluI</i> Fragment bp -828 bis +1563 bp in YEplac195-GFP	J. Stolz, Regensburg
YEplac196-GAL1prom-GFP-MCH5	<i>MCH5</i> <i>NotI/ScalI</i> Fragment bp +2 bis +2049 bp in YEplac196-Gal1prom-GFP	diese Arbeit (siehe N-terminal markiertes <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
YEplac196-GAL1prom-9myc-MCH5	<i>MCH5</i> <i>NotI/ScalI</i> Fragment bp +2 bis +2049 bp in YEplac196-Gal1prom-9myc	diese Arbeit (siehe N-terminal markiertes <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
pRS316-GAL1prom-9myc-MCH5	GAL1prom-9myc mit <i>MCH5</i> <i>NheI/EcoRI</i> Fragment bp +2 bis +1773 bp aus YEplac196-Gal1prom-9myc in pRS316	diese Arbeit (siehe N-terminal markiertes <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
p426-TDH-MCH5	<i>MCH5</i> <i>BamHI/BamHI</i> Fragment +1 bp bis +1566 bp in p426-TDH	diese Arbeit (siehe <i>MCH5</i> -Konstrukte)*
MCH5prom-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -828 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom755-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -755 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom654-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -654 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom531-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -531 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom398-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -398 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom215-lacZ	<i>MCH5</i> <i>PstI/XbaI</i> Fragment bp -215 bp bis -1 bp in YCplac33 vor <i>lacZ</i> ohne Promotor	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*
MCH5prom/mut-lacZ	MCH5prom-lacZ, Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle durch TAATTGAAGCTTCTTCT ersetzt	diese Arbeit (siehe MCH5prom-lacZ-Konstrukte)*

E. coli – S. pombe Shuttle-Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pREP3x	<i>ori, amp^r, LEU2, ura4+, ars1, nmt1</i> -Promotor	(Forsburg 1993)
pREP3-MCH5	<i>MCH5</i> <i>SalI/BamHI</i> Fragment bp +1 bis +1566 bp in pREP3x	diese Arbeit (siehe <i>MCH5</i> -Konstrukte)*

* Klonierung siehe Kapitel 2.2.2.8

2.1.3 Oligonukleotide

Oligo	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
PR5	ATATGCGGCCGCATGGAGGAAGGTTA TTGAACATCTATTAGTC	RIB5 bp - 121 bis -89, enthält eine <i>NotI</i> Schnittstelle
PR6	ATATGCGGCCGCATTATTCTGGGG TGAACAAGAC	RIB5 bp + 1123 bis + 1148, enthält eine <i>NotI</i> Schnittstelle
PR7	CCCAGGATTCACTTAATGTTGCCTC	RIB5 bp -296 bis - 273
PR8	GGCCTCTCTCAGCAGCTCATCC	RIB5 bp + 1416 bis + 1438
PR14	ATATGCGGCCGCAGCTCAGACAGTT TAACGCC	MCH5 bp +2 bis + 23, ohne Start ATG, enthält eine <i>NotI</i> Schnittstelle
PR15	TAGAATTCGAACGAACTCGCAAAATG G	MCH5 bp + 2119 bis + 2128, enthält eine <i>EcoRI</i> Schnittstelle
PR18	ATATGCATGCTATTTCTTTTAATC TATAGTAAAATCAGAGC	MCH5 bp -34 bis -1 enthält eine <i>SphI</i> Schnittstelle
PR33	ATATGTCGACATGAGCTCAGACAGTT TAACGCC	MCH5 bp + 1 bis + 23 enthält eine <i>Sall</i> Schnittstelle
PR36	AAACTGCAGCGATTGCTGAAACGGAT C	MCH5 bp - 755 bis - 738 enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR37	AAACTGCAGCGAACTGCTTAACCAA ATTAATAT	MCH5 bp - 654 bis - 630 enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR38	AAACTGCAGAGTCACAACGCACCTGT T	MCH5 bp - 531 bis - 512 enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR39	AAACTGCAGCGCGCTGTTCTATAGAC G	MCH5 bp - 398 bis - 380 enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR40	AAACTGCAGCTATTGGTTAGATCTC CCAGTAG	MCH5 bp - 213 bis - 189 enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR41	ATGGATCCTCAGACAGTTAACGCCT AAAGAC	MCH5 bp + 7 bis + 30, enthält eine <i>BamHI</i> Schnittstelle
PR45	ATACTGCAGTTAACGCCTGAATCCAC CCTCCG	MCH5 bp + 299 bis + 317, enthält ATT als Stop Codon, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
PR46	ATATAAGCTTCAATTAGATCATAAT AACAGGTGCGTTGTG	MCH5 bp -526 bis - 502, Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle ersetzt, enthält eine <i>HindIII</i> Schnittstelle
PR47	ATATAAGCTTCTTCTACATCGTCGGTT GAATACTGCGC	MCH5 bp - 485 bis - 462, Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle ersetzt, enthält eine <i>HindIII</i> Schnittstelle
PR53	TAGCAAGAACCTAAGGATCCGTCTAT AGAAAGAACCTCGAAAAATCTCGCG CCAGATCTGTTAGCTTGCC	Bindet in <i>kanMX-GAL1</i> prom, Überhang von <i>FADI</i> bp - 148 bis - 99
PR54	GAGTTTGTTATCTCATAACACATCTC AGCAGCCTTGCTCAACTGCATATTGT ATTACAGCTGCTAGTAGTCCGATCCG G	Bindet in <i>kanMX-GAL1</i> prom, Überhang von <i>FADI</i> bp - 5 bis + 16

Oligo	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
PR55	GCACCA GATTGCCTTGTGATTG	<i>FADI</i> bp + 396 bis + 419
PR56	ATATGGATCCCCCTCTATGCTTC TTTGATAAAGAGG	<i>PUTI</i> bp + 46 bis + 75, enthält eine <i>BamHI</i> Schnittstelle
PR58	ATATGTCGACTTATCATAGGCCTACT CTTTTGAATCGAC	<i>PUTI</i> bp + 1404 bis + 1431, zusätzliches Stopcodon, enthält eine <i>Sall</i> Schnittstelle
JS63	CGCGTCTGTGAGGGGAGCG	Überprüfung von <i>kanMX/his5</i> ⁺ Integration, bindet im <i>TEF</i> Promotor
JS79	CGCCTCGACATCATCTGCC	Überprüfung von <i>kanMX/his5</i> ⁺ Integration, bindet im <i>TEF</i> Terminator
JST75	TTTCTGCAGAAAAATAATGAGCTCA GACAGTTAACG	<i>MCH5</i> bp + 1 bis + 21, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
JST83	GCGGATAACAATTCACACAGG	Vorwärtsprimer für pUC, M13 und YEp Plasmide, bindet 25 bp nach der <i>HindIII</i> Schnittstelle in pUC19
JST84	TTAAGTTGGTAACGCCAGG	Rückwärtsprimer für pUC, M13 und YEp Plasmide, bindet 37 bp vor der <i>EcoRI</i> Schnittstelle in pUC19
JST90	CGATCAGGTCCGGGTACAC	<i>RIB4</i> bp - 353 bis - 334
JST91	GGTTTGACATCGGCTCCGTACC	<i>RIB4</i> bp + 797 bis + 819
JST101	ATATCTGCAGAAAATGCCTCTATCAA AGGTGGAGC	<i>MCH1</i> bp + 1 bis + 22, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
JST104	ATATCTGCAGAAAATGTCCGAAGAAC GGCATG	<i>MCH2</i> bp + 1 bis + 19, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
JST107	AAACTCGAGAAAATGTCAACGCCT CAAACGACTAC	<i>MCH3</i> bp + 1 bis + 24, enthält eine <i>XhoI</i> Schnittstelle
JST110	AAACTGCAGAAAATGTTGAACATTCC CATAATTGCTAAC	<i>MCH4</i> bp + 1 bis + 27, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
JST112	AAACTGCAGCGATCATACTAGAACCC ACAGTCG	<i>MCH5</i> bp - 828 bis - 803, enthält eine <i>PstI</i> Schnittstelle
JST127	TTTTCTAGATTCTGAGTTTCTACTTT TTAATTTC	<i>MCH1</i> bp + 1430 bis + 1457, enthält eine <i>XbaI</i> Schnittstelle
JST128	TTTTCTAGACTCTCCTAGGTATTGTT TATAACG	<i>MCH2</i> bp + 1393 bis + 1421, enthält eine <i>XbaI</i> Schnittstelle
JST129	TTTTACTAGTTAGACCTTCATTGGATA TACCATCTTAGG	<i>MCH3</i> bp + 1992 bis + 2021, enthält eine <i>SpeI</i> Schnittstelle
JST130	TTTTCTAGAACTTACAAAGCTTCGCA CCAACG	<i>MCH4</i> bp + 1479 bis + 1502, enthält eine <i>XbaI</i> Schnittstelle
JST131	TTTTCTAGAACTGACCCACTTGAAG CCAAC	<i>MCH5</i> bp + 1540 bis + 1562, enthält eine <i>XbaI</i> Schnittstelle
JST163	AACTGCA <u>GCTAGC</u> ACGGATTAGAAG CCGCCGAG	Oligo zur Amplifizierung des <i>GAL1</i> -Promotors aus pYES2, <i>GAL1</i> bp - 454 bis - 435, enthält eine <i>PstI</i> und eine <i>NheI</i> Schnittstelle

Oligo	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
JST168	ATATATGCATTAAATATTCCCTATAG TGAGTCGTATTACAGC	Oligo zur Amplifizierung des <i>GAL1</i> -Promotors aus pYES2, enthält eine <i>NsiI</i> Schnittstelle
JST171	AAAAATGCATGGTGCAGAGCAGAAA CTAATTCTG	Oligo zur Klonierung von 9myc, enthält eine <i>NsiI</i> Schnittstelle
JST172	TTTGCATGCGGCCGCTCCGGACAGT AAATCTCCTCGCTTATTAACCTCTGC	Oligo zur Klonierung von 9myc, enthält eine <i>SphI</i> , eine <i>NotI</i> und eine <i>BspEI</i> Schnittstelle
JST178	TTTGCATGCGGCCGCTCCGGATTGT ACAATTCCATACCATGG	Oligo zur Klonierung von GFP, enthält eine <i>SphI</i> Schnittstelle
JST179	ATATATGCATTCTAAAGGTGAAGAAT TATTCACTGG	Oligo zur Klonierung von GFP, enthält eine <i>NsiI</i> Schnittstelle
JST194	CGACGATCTCTTAGGGGCAGAC	<i>LEU2</i> bp + 3 bis + 25
JST195	TGAGAAGATGCGGCCAGC	<i>URA3</i> bp + 779 bis + 796
JST196	GGACTAGGATGAGTAGCAGCACG	<i>URA3</i> bp + 25 bis + 47

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo BioSciences GmbH, Ulm und Operon Biotechnologies GmbH, Köln bezogen.

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

- Medien für *E. coli*:

- 2TY-Medium:	0,5 %	Hefeextrakt
	2 %	Trypton
	10 mM	NaCl
	15 %	Agar (für Platten)
	100 mg/l	Ampicillin (zur Selektion)

- SOC-Medium:	0,5 %	Hefeextrakt
	2 %	Trypton
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂
	100 mg/l	Ampicillin (zur Selektion)

- Medien für *S. cerevisiae* und *S. pombe*:

- YPD-Medium:	1 %	Hefeextrakt
	2 %	Pepton
	2 %	Glucose
	2 %	Agar (für Platten)
- YE-Medium:	0,5 %	Hefeextrakt
	3 %	Glucose
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker

- SD-Medium:	0,67 % 2 % 2 %	YNB (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne AS) Glucose Agar (für Platten)
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- SDGal-Medium:	0,67 % 2 % 2 %	YNB (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne AS) Galactose Agar (für Platten)
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- SD-Medium ohne Riboflavin:	0,67 % 2 % 2 %	YNB (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne AS, ohne Vitamine) Glucose Agar (für Platten)
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker Vitaminmischung ohne Riboflavin
- MMPro-Medium:	0,17 % 0,75 % 2 % 2 %	YNB (ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne AS) Prolin Glucose Agar (für Platten)
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- MMUrea-Medium:	0,15 % 0,1 % 2 % 2 %	YNB (ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne AS) Harnstoff Glucose Agar (für Platten)
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- YADE-Medium:	2 % 0,2 % 0,2 % 3 %	Hefeextrakt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Glucose Ethanol
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- Präsporulationsmedium:	5 % 3 % 1 % 2 %	Glucose Nutrient Broth Hefeextrakt Agar
- Sporulationsmedium:	1 % 0,005 %	Kaliumacetat Zinkacetat
		AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- Starvation Medium:		SD-Medium ohne Met AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker, außer Met
- Chase Medium:		SD-Medium mit 10 mM Cys und 10 mM Met AS und Nukleotide entsprechend der Auxotrophiemarker
- EMM-Medium:	3,2 %	EMM
-Aminosäuren- und Nucleotide :		Adenin: 20 mg/l Histidin: 20 mg/l Leucin: 30 mg/l Lysin: 30 mg/l Methionin: 20 mg/l Uracil: 20 mg/l

- Puffer und Lösungen:

- AE-Puffer:	50 mM 10 mM	Natriumacetat pH 5,3 EDTA
- Aufbruchspuffer:	2 % 1 % 100 mM 10 mM 1 mM	Triton X-100 SDS NaCl Tris/HCl pH 8,0 EDTA
- Aufnahmetestpuffer:	50 mM 12 mM	Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 KCl
- Blockierungspuffer für Westernblots:	1 x 0,1 % 1 %	PBS Tween 20 Milchpulver
- Citrat-Phosphat-Puffer	30 mM 40 mM	Citronensäure, pH 4,2 Na_2HPO_4
- Coomassie-Färbelösung:	0,5 % 10 % 20 %	Coomassie Essigsäure Isopropanol
- DNA-Ladepuffer (10x):	100 mM 60 % 0,25 % 0,25 %	EDTA Glycerin Bromphenolblau Xylen Cyanol
- Elutionspuffer:	10 mM	Maltose in Säulenpuffer
- HEPES-Puffer:	0,1 M 3 mM	HEPES pH 7,5 MgCl_2
- Homogenisierungspuffer:	50 mM 0,4 M 1 mM	Tris (pH 8,2) Mannit EDTA
- KCP-Puffer:	0,1 M 0,1 M	K_2HPO_4 pH 5,9 Citronensäure
- KP _i -Puffer:	0,1 M	Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5
- LiAc/TE:	10 % 10 %	1 M LiAc pH 7,5 TE (10x)
- LiAc/TE/PEG:	10 % 10 % 80 %	1 M LiAc pH 7,5 TE (10x) Polyethylenglykol 3350 (50 %)
- Lysis-Puffer:	0,8 M 10 mM 2 mM 1 mM	Sorbit MOPS pH 7,2 EDTA PMSF
- PARA:	7,4 %	Paraformaldehyd in 2x PEM

- PBS (10 x):	2,6 g/l 22,5 g/l 87,7 g/l	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 Na ₂ HPO ₄ NaCl
- PEM (4x):	0,4 M 20 mM 20 mM	Pipes pH 6,9 EGTA MgCl ₂
- PMSF:	100 mM	PMSF in DMSO
- Sammelgelpuffer:	0,139 M 0,11 M	Tris/HCl pH 6,8 SDS
- Säulenpuffer:	20 mM 11,7 % 1 mM 1 mM 0,7 %	Tris/HCl pH 7,4 NaCl EDTA NaN ₃ β-Mercaptoethanol
- SDS-Laupuffer (5x)	1,5 % 0,5 % 7,2 %	Tris SDS Glycin
- SDS-Probenpuffer (4x):	250 mM 8 % 20 % 20 % 0,4 %	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
- SDS-Puffer:	0,1 %	SDS in PBS
- STET-Puffer:	8 % 50 mM 50 mM 5 %	Saccharose Tris/HCl pH 8,8 EDTA pH 8,0 Triton X-100
- TBE (5 x)	445 mM 5 mM	Tris/Borat pH 8,0 EDTA
- TE	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA
- TE (10x)	100 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA
- TE (Prot)	25 mM 5 mM	Tris/HCl pH 7,5 EDTA
- Testpuffer:	0,1 M 5 mM 5 mM	KPO ₄ (pH 7,6) EDTA Saccharose
- Transferpuffer (2x):	0,48 % 2,24 % 0,4 % 0,04 %	Tris Glycin Methanol SDS
- Trenngelpuffer (3 x):	1,126 M 0,3 M	Tris/HCl pH 8,8 SDS

- Tween-IP-Puffer:	50 mM 150 mM 0,5 % 0,1 mM	Tris/HCl pH 7,5 NaCl Tween-20 EDTA
- Tween-Urea-Puffer:	100 mM 200 mM 2 M 0,5 %	Tris/HCl pH 7,5 NaCl Harnstoff Tween-20
- Urea-boiling-Puffer:	50 mM 1 mM 1 % 2 M	Tris/HCl pH 7,5 EDTA SDS Harnstoff
- Verdau-Lösung:	300 µg/ ml 40 µg/ ml	Zymolyase in KCP Pepstatin
- Z-Puffer:	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM 50 mM	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl MgSO ₄ β-Mercaptoethanol

2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Applichem, Darmstadt: MES, MOPS, IPTG

Amersham, , Cys/Met ³⁵S Labeling Mix

Becton Dickinson, LePont de Claix (Frankreich): Bacto Pepton, Bacto Trypton, Hefeextrakt, YNB ohne AA, YNB ohne AA und AS

BIO 101, Heidelberg: YNB ohne Vitamine, EMM

Calbiochem, San Diego (USA): G418

Eppendorf, 2 ml Reaktionsgefäß „Safelock“

FujiFilm

Gilson, Bad Camberg: Pipettenspitzen (10µl)

Greiner, Kremsmünster (Österreich): Plastikröhrenchen (15 und 50 ml), Pipettenspitzen, Petrischalen

MBI-Fermentas, St Leon: Restriktionsenzyme und Puffer, T4-DNA Ligase und Puffer, 1 kb DNA Standard „Gene Ruler“

Merck, Darmstadt: Glyzerin, Isopropanol, Methanol, Ethanol, Glucose, Borsäure, Kupfersulfat, Kaliumiodid, Eisenchlorid, Mangansulfat, Zinksulfat, Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Calciumchlorid

Millipore, Molsheim (Frankreich): Steriflip (50 ml Vakuum Sterilfilter)

neoLab, Heidelberg: Impfösen 1 und 10 µl, steril

NewEnglandBiolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme und Puffer, Proteinstandard

Peqlab, Erlangen: Universal Agarose

Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn: Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrat

Quiagen, Hilden: QIAprep Spin Miniprep Kit (50), QIAquick Gel Extraction Kit (50), MinElute Gel Extraction Kit (50)

Roth, Karlsruhe: EtBr, Ampicillin, Glasperlen (0,25-0,5 mm), Agar-Agar, 2 ml Cryoröhrenchen, Mikrotiterplatten, 0,2 ml PCR Tubes, Spritzen Sterilfilter „Rotilabo“ 0,22 µm, Szintillationscocktail Rotiszint eco plus, Aqua Roti-Phenol, Roti-Phenol

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA): anti-myc-AK (sc-788), anti-HA-AK (sc-805)

Sarstedt, Nümbrecht: 1 ml Plastikküvetten, 1,5 ml Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen

Schleicher&Schuell, Dassel: Nitrocellulose Transfermembran „Protran“

Sigma-Aldrich, Steinheim: Alle Chemikalien die nicht anders aufgeführt sind

USB, Bad Homburg: Tris

Das [¹⁴C]-markierte Riboflavin war ein Geschenk von Prof. Dr. R. Krämer, Köln. Die spezifische Aktivität des Riboflavins beträgt 5,54 MBq/ mg Riboflavin. Die Aktivität der Riboflavinlösung beträgt ca 10 µCi/ ml.

2.1.6 Geräte

Abimed	Pipetten (1000/ 200/ 20/ 10µl)
Amersham	Photometer Ultrospec 3100 pro
Beckman	Szintillationszähler LS 6000SC, L8-70M Ultrazentrifuge
BIO101	Ribolyser Thermo Savant, Fast Prep FP 120
Biometra	T3 Thermocycler
Biorad	Gel Elektrophorese Apparaturen, Spannungssquelle PowerPac ^{HC}
Christ	SpeedVac RVC 2-18
Eppendorf	Zentrifuge 5417R, Zentrifuge Mini Spin plus, Thermomixer 5436
Epson	Scanner Epson Perfection 3200 Photo
Hettich	Zentrifuge Rotina 35R
Heraeus Instruments	Wärmeschrank
Hoefer Scientific	Geltrockner SE 540
ICN Biomedicals	Sterilbank BSB 4A
Kaiser, Konrad Benda	Videokamera RA2, UV-Flächenstrahler
Kern	Feinwaage 770
Leica	Mikroskop DMLS
Memmer	Wärmeschränke
New Brunswick Scientific	Luftschüttler G25, Wasserbadsschüttler
Protec	Entwicklermaschine Optimax 2010
Singer	System 300 Tetrad Dissection Mikroscope
Sorvall	Zentrifuge Evolution RC
Wolf	SANOClav Tischautoklav
WTW	Digital pH-Meter

2.1.7 Internetdienste

BLAST-Suchprogramm	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
EUROSCARF	http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html
ExPASY	http://kr.expasy.org/
Fraenkel Lab	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/yeast/gbrowse.cgi/yeast
Genolevures	http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php
Google	http://www.google.de/
PFAM	http://www.sanger.ac.uk/
Proteome	http://www.proteome.com/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
Saccharomyces Genome Database	http://www.yeastgenome.org/
Schmelzpunktberechnung	http://www.cnr.berkeley.edu/zimmer/oligoTMcalc.html
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

2.1.8 Software

Bearbeitung von DNA-Sequenzen:	DNA Strider 1.4f13
Dokumentation von Dauerkulturen:	FileMaker Pro 2.1
Diagramme, Tabellen:	Microsoft Excel 2004
Textverarbeitung:	Microsoft Word 2004
Bildbearbeitung:	Adobe Photoshop 7.0
Abbildungen:	Adobe Illustrator 10

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Wachstumsmethoden

2.2.1.1 Anzuchtbedingungen und Anlegen von Dauerkulturen

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C in 2TY. Bei Plasmid tragenden Stämmen wurde 100 mg/ l Ampicillin zugesetzt.

Die *S. cerevisiae* und *S. pombe* Zellen wurden bei 30 °C angezogen.

Für Stämme, die kein Plasmid tragen, wurde YPD (bei *rib*-Mutanten mit 20 mg/ l Riboflavin) zur Anzucht verwendet. Plasmidtragende Bäckerhefen wurden in verschiedenen Minimalmedien mit den jeweils nötigen Supplementen vermehrt, während die Vermehrung der Spalthefen mit Plasmid in EMM auch hier mit den jeweils nötigen Supplementen erfolgte. Die Zelldichte in Flüssigkulturen wurde photometrisch über die OD bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden frisch angezogene Flüssigkulturen abzentrifugiert und in frischem Medium mit 20 % Glycerin aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Durchführung von Wachstumstests

Für Wachstumstests wurden die jeweiligen Zellen zu einer OD₆₀₀ von 0,6 in Wasser resuspendiert und je 100 µl in Mikrotiterplatten pipettiert. In Mikrotiterplatten wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 hergestellt. Die Zellsuspensionen wurden mit einem 48-zähnigen Edelstahlstempel von der Mikrotiterplatte auf die jeweiligen Medienplatten übertragen.

2.2.1.3 Sporulation von *S. cerevisiae*

Die Zellen zur Sporulation wurden zunächst bei 30 °C üN auf YPD-Platten angezogen und dann noch zweimal üN auf Präsporulationsmedium. Eine kleine Menge dieser Zellen wurde in Sporulationsmedium resuspendiert, zunächst für 5 d bei 25 °C und dann noch für mindestens 3 d bei 30 °C inkubiert. Ab dem dritten Tag bei 30 °C wurde die Sporulationseffizienz bestimmt und die Zellen bei 30 °C weiter inkubiert, bis genug Tetraden vorhanden waren.

2.2.1.4 Tetraden Dissektion

Von der sporulierten Kultur wurden 50 µl geerntet, in 50 µl Zymolyase (2,5 mg/ ml Zymolyase 20000 T in 1 M Sorbit) resuspendiert und 10 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurde zu den Zellen, auf Eis 800 µl kaltes Wasser vorsichtig zugegeben. Von dieser Suspension wurde mit einer 10 µl Impföse am Rand einer YPD-Platte (für die *rib*-Mutanten auf YPD mit 20 mg/ l Riboflavin) ausgestrichen und die Sporen mit dem Singer System 300 Tetrad Dissection Microscope vereinzelt. Die YPD-Platte mit den vereinzelten Sporen wurde für 2 d bei 30 °C inkubiert.

2.2.1.5 Isolation von *rib*^{*}-Mutanten

Um Riboflavinbiosynthesemutanten, die auf YPD ohne zusätzliches Riboflavin wieder wachsen können zu isolieren, wurden ca. 10^6 Zellen auf YPD Platten ausplattiert und für 6 d bei 30 °C inkubiert. Kolonien die auf diesen Platten wachsen konnten, wurden auf neuen YPD Platten ausgestrichen und erneut für 3 d bei 30 °C inkubiert.

2.2.2 Allgemeine genetische Methoden

Standardmethoden (Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, Auf trennung der DNA über Gelelektrophorese, Dephosphylierung, Ligation, Transformation von *E. coli*) wurden wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt.

Die Plasmid Präparation von *E. coli* erfolgte entweder nach der STET Methode von Holmes und Quigley (1981) oder mit dem QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit.

E. coli Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) kompetent gemacht.

2.2.2.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Auf trennung der DNA wurden 0,8 – 1,4 %ige Gele aus Universal Agarose in TBE verwendet. Die DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit oder dem MinElute Gel Extraction Kit von Quiagen aus dem Gel eluiert.

2.2.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation der Hefezellen erfolgte nach der Methode von Gietz *et al.* (1992) und Schiestl und Gietz (1989). Die Zellen wurden hier mit LiAc kompetent gemacht und mit 2 – 5 µg DNA transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausgebracht. Bei der Selektion auf G418 Resistenz wurden die Zellen nach der Transformation noch für 2 h bei 30 °C in YPD inkubiert, bevor sie auf die Selektionsplatten ausgebracht wurden. Die Selektionsplatten wurden für 2 - 5 d bei 30 °C bebrütet.

2.2.2.3 Transformation von *S. pombe*

Die *S. pombe* Zellen wurden nach der Methode von Bahler *et al.* (1998) kompetent gemacht und transformiert. Dafür wurden die Zellen üN in YE auf eine OD₆₀₀ von 1 angezogen. Je Transformation wurden 20 ml geerntet und erst mit Wasser und dann mit 1 ml LiAc/ TE gewaschen und in 100 µl LiAc/ TE aufgenommen. Es wurden 2 µl Carrier DNA (10mg/ ml) und 10 µl Plasmid-DNA zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden 260 µl LiAC/ TE/ PEG zugegeben und die Suspension wurde für 30 min auf 30 °C erwärmt. Danach wurden 43 µl DMSO zugegeben und die Zellen für 5 min bei 42 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden für 2 - 4 d bei 30 °C bebrütet.

2.2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von genomischer DNA wurde nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) durchgeführt. Dazu wurden 5 ml einer YPD üN Kultur geerntet und in 200 µl Aufbruchspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Glasperlen wurden die Zellen im Ribolyser für 30 Sekunden auf Stufe 5 aufgebrochen. Anschließend wurden 200 µl TE zugegeben und 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. 200 µl der wässrigen Phase wurden in neuen Reaktionsgefäßten zur Fällung zu 1 ml 100 % Ethanol gegeben und für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde für 5 min bei 65 °C in 400 µl TE, das 10 mg/ ml Ribonuclease A enthält, inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol, der 40 mM Ammoniumacetat enthält, erneut gefällt. Die DNA wurde erneut abzentrifugiert, getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode von Robzyk und Kassir (1992). Die Zellen wurden üN in Selektivmedium bis zur Sättigung angezogen und 1,5 ml der Kultur geerntet. Die Zellen wurden in 100 µl STET-Puffer aufgenommen, 0,2 g Glasperlen zugegeben und im Ribolyser für 30 sec bei Stufe 5 aufgebrochen. Es wurde erneut 100 µl STET-Puffer zugegeben und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurde die Suspension 10 min lang bei 4 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß gebracht, 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat zugegeben und für 1 h bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4°C zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit 200 µl kaltem 100 % Ethanol gefällt und für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Zur Transformation in *E. coli* wurden 5 µl dieser Präparation verwendet.

2.2.2.6 DNA-Sequenzanalysen

Alle Sequenzierungen von Plasmiden wurden von der Firma Seqlab, Göttingen als Hotshot oder extended Hotshot durchgeführt.

2.2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurden die Taq-Polymerase, Vent-Polymerase und die Phusion Polymerase (alle New England Biolabs) verwendet. Gewöhnlich wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden den Oligos, der Länge des PCR-Produkts und den jeweils eingesetzten Polymerasen angepasst. Die Amplifikation erfolgte mit dem T3 Thermocycler von Biometra. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert.

2.2.2.8 Klonierung verschiedener Plasmide

- Disruptionskonstrukte

Zur Klonierung des Litmus28-rib4::HIS3 Konstrukts wurde das *RIB4*-Gen mit *Bg*/II und *Xba*I aus einem Genbankplasmid herausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen von Litmus28 ligiert. Das Plasmid wurde mit *Bam*HI und *Sa*II im *RIB4*-Gen geschnitten und ein *HIS3* *Bam*HI/ *Xho*I Fragment aus pUC19-HIS3 eingesetzt.

pCH1-rib5::kanMX wurde hergestellt, indem *rib5Δ::kan*MX mit den Oligos PR5/ PR6 aus genomischer DNA des *rib5Δ::kan*MX-Stammes amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde mit *Not*I/ *Not*I und in die gleiche Schnittstelle von pCH1 ligiert. Aus diesem Vektor wurde durch den Austausch der Disruptionskassette der Vektor pCH1-rib5::HIS3MX hergestellt. Die *kan*MX-Kassette wurde mit *Nco*I und *Scal* aus dem Vektor geschnitten und durch das *Nco*I/ *Scal* HIS3MX-Fragment aus pFA6a-HIS3MX ersetzt.

Die Klonierung von pBS-mch5::URA3 erfolgte, indem zunächst das *Eco*RI/ *Sa*II *MCH5*-Fragment aus pRS426-MCH5 in die gleichen Schnittstellen von pBlueskript kloniert wurde. *MCH5* wurde mit *Bg*/II/ *Bg*/II geschnitten und in diese Schnittstellen das *Bam*HI/ *Bam*HI *URA3*-Fragment aus YDp-U kloniert.

- pMAL-Konstrukte

Der Vektor pMAL-c2x-MCH5 wurde kloniert, indem das *Bam*HI/ *Pst*I *MCH5*-Fragment, aus dem PR41/ PR45 PCR-Produkt, in die gleichen Schnittstellen von pMAL-c2x ligiert wurde.

Für das pMAL-c2x-PUT1 Konstrukt wurde das *Bam*HI/ *Pst*I *PUT1*-Fragment, aus dem PR56/ PR58 PCR-Produkt, ebenfalls in die gleichen Schnittstellen von pMAL-c2x ligiert.

- pYES-Konstrukte

Zur Klonierung der pYES-Konstrukte wurden die *MCH*-PCR-Produkte, jeweils in die *Srf*I-Schnittstelle von pPCR-Skript subkloniert. Die subklonierten PCR-Produkte von *MCH1* (JST101/ JST127), *MCH2* (JST104/ JST128) und *MCH4* (JST110/ JST130) wurden jeweils mit *Eco*RI und *Xba*I ausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen von pYES2 ligiert.

Die Herstellung von pYES-MCH3 wurde das *Spe*I/ *Not*I *MCH3*-Fragment, aus dem in pPCR-Skript klonierten PCR-Produkt aus JST107/ JST129, in die *Xba*I/ *Not*I Schnittstellen von pYES2 kloniert. Das subklonierte *MCH5*-PCR-Produkt aus JST15/ JST131 wurde mit *Bam*HI ausgeschnitten und in die *Bam*HI-Schnittstelle von pYES2 eingesetzt.

- N-terminale Fusionen an Mch5p

Zur Klonierung von YEplac196-GAL1prom-GFP-MCH5 bzw. YEplac196-GAL1prom-9myc-MCH5 wurden zunächst die Vektoren YEplac196-GAL1prom-GFP und YEplac196-GAL1prom-9myc hergestellt. Dazu wurde der Vektor YEplac196 mit *Nhe*I und *Eco*RI geschnitten und mit dem *Nhe*I/ *Nsi*I Fragment des *GAL1*-Promotor (aus dem PCR-Produkt aus JST163/JST168 erhalten) und dem *Nsi*I/ *Eco*RI Fragment von GFP (aus dem JST178/ JST179 PCR-Produkt) bzw. dem *Nsi*I/ *Eco*RI Fragment von 9myc (aus dem JST171/ JST172 PCR-Produkt) in einer 3-Wege-Ligation ligiert. Die Vektoren wurden jeweils mit *Not*I und *Sma*I geschnitten und ein *Not*I/ *Scal* *MCH5*-Fragment (aus dem PCR-Produkt von PR14/ PR15) in den Vektor eingesetzt.

Zur Klonierung von pRS316-GAL1prom-9myc-MCH5 wurde das *NheI/ EcoRI* GALprom-9myc-MCH5-Fragment (aus YEplac196-GAL1prom-9myc-MCH5) in die *SpeI/ EcoRI* Schnittstellen von pRS316 kloniert.

- andere *MCH5*-Konstrukte

p426-TDH-MCH5: *MCH5* wurde *BamHI* aus pYES-MCH5 isoliert und in die gleichen Schnittstellen von p426-TDH ligiert.

pREP-MCH5: Vektor pREP3x wurde mit *SalI* und *BamHI* geschnitten und mit dem *SalI/ SphI* *MCH5*-Fragment (aus dem PCR-Produkt aus PR33/ JST131) und dem *SphI/ BamHI* *MCH5*-Fragment (aus pYES-MCH5) in einer 3-Wege-Ligation zusammengefügt.

- MCH5prom-lacZ-Konstrukte

Die Klonierung der MCH5prom-lacZ-Konstrukte erfolgte stets in dem mit *PstI* und *XbaI* geschnittenen Vektor YCplac33 und dem *SphI/ XbaI lacZ*-Fragment (aus YCplac-vp8-lacZ). Zur Herstellung von MCH5prom-lacZ wurde das *PstI/ XbaI* *MCH5*-Fragment aus dem PCR-Produkt PR18/ JST112 in YCplac33 vor *lacZ* kloniert.

Die Klonierung von MCH5prom755-lacZ (PCR-Produkt PR18/ PR36), MCH5prom654-lacZ (PCR-Produkt PR18/ PR37), MCH5prom531-lacZ (PCR-Produkt PR18/ PR38), MCH5prom398-lacZ (PCR-Produkt PR18/ PR39) und MCH5prom215-lacZ (PCR-Produkt PR18/ PR40) erfolgte mit den gleichen Enzymen und Fragmenten wie die von MCH5prom-lacZ, jedoch mit anderen *MCH5*-Fragmenten.

MCH5prom/mut-lacZ wurde mit dem *PstI/ BamHI* *MCH5*-Fragment (aus dem JST112/ PR46 PCR-Produkt), dem *BamHI/ SphI* *MCH5*-Fragment (aus dem PR18/ PR47 PCR-Produkt), dem *SphI/ XbaI lacZ*-Fragment und dem mit *PstI* und *XbaI* geschnittenen Vektor YCplac33 in einer 4-Wege-Ligation hergestellt.

2.2.2.9 Durchführung eines DNA-Microarrays

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Schmitt *et al.* (1990) durchgeführt. Es wurden je 50 OD der zu untersuchenden Zellen geerntet, in 1 ml Wasser aufgenommen, kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zum Aufbrechen in flüssigem N₂ eingefroren und danach in 400 µl AE-Puffer resuspendiert. Es wurden 40 µl 10 % SDS zugegeben, gevortext und 440 µl AE equilibriertes Phenol zugegeben. Die Suspension wurde 4 min bei 65 °C inkubiert, danach das Phenol in einem Trockeneis/Ethanolbad kristallisiert und für 2 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 400 µl Phenol/ Chloroform (1:1) zugegeben, 1 min gevortext und für 5 min bei RT stehengelassen. Dann wurde für 2 min zentrifugiert, die wässrige Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) zugegeben. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 100 % Ethanol auf 70 Vol % Ethanol gebracht und für 1 h bei -20 °C gefällt. Es wurde erneut zentrifugiert, die Zellen mit 80 %igem Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 20 µl Wasser (DEPC behandelt) aufgenommen. Die RNA wurde in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Der DNA-Array wurde durch das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) durchgeführt. Die RNA wurde zunächst gereinigt, wobei eventuell vorhandene Proteine und Phenol entfernt wurden. Das Prinzip des Mikroarrays ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

Die gereinigte RNA (Abb.2-1a) wurde daraufhin in eine cDNA (Abb.2-1b) umgeschrieben. Dies erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst hybridisierte die RNA mit einem T7-Oligo (dT). Die Oligo-dT-Sequenz band an den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNAs. Der Primer diente der Reversen Transkriptase als Promotor, das Enzym synthetisierte den ersten Strang der cDNA. In einer zweiten Reaktion wurde die RNA durch die RNase H verdaut und der zweite Strang der cDNA mittels der DNA-Polymerase I synthetisiert. Die gebildete cDNA diente der Herstellung einer biotinylierten cRNA (Abb.2-1c). Diese Reaktion wurde von der T7-RNA-Polymerase katalysiert, so dass nur der Antisense cRNA-Strang gebildet werden konnte. Für die Transkription wurde mit Biotin-markiertes Uracil verwendet, alle anderen Nukleotide waren unmarkiert.

Nach einer Reinigung erfolgte die Fragmentierung der cRNA (Abb.2-1d), diese wurde zum Hybridisieren ü.N. auf den Affimetrix®-Chip (Abb.2-1e) gegeben. Anschließend wurde der Chip gewaschen, um nicht-hybridisierte RNA zu entfernen und mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt (Abb.2-1f). Zum Schluss erfolgte das Scannen des Chips und die Quantifizierung der Genexpression (Abb.2-1g).

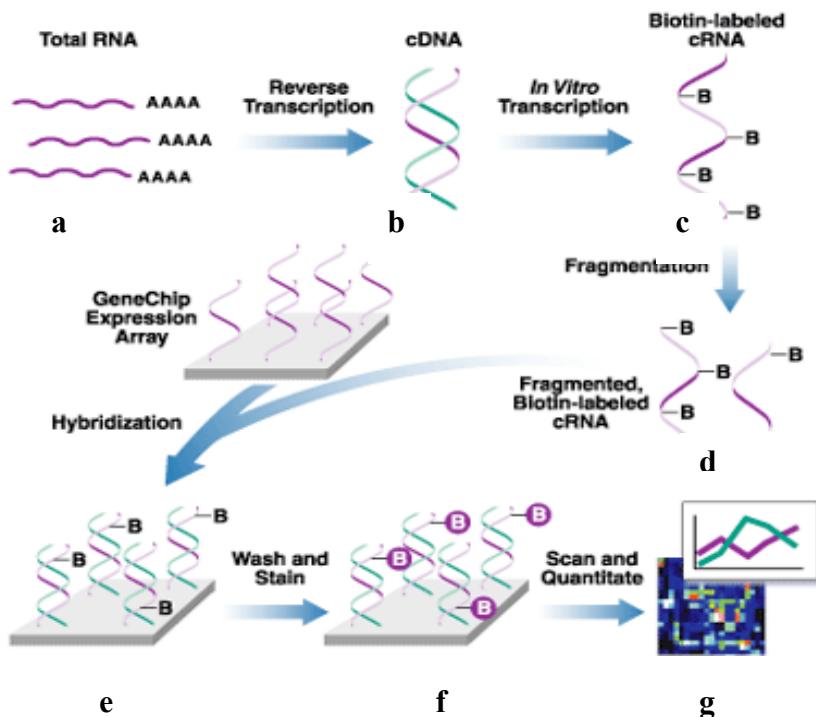


Abb. 2-1: Prinzip des DNA-Mikroarrays. Nach dem Affimetrix®-Handbuch.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Für diese Bestimmung wurde die Proteinlösung zur Bradfordlösung gegeben und für 5 min stehen gelassen. Die Extinktion des Reaktionsprodukts wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte über eine Kalibriergerade, die mit BSA-Lösungen im Reaktionsansatz erstellt wurde.

2.2.3.2 Isolierung von Proteinen

Die Isolierung von Proteinen erfolgte immer auf Eis, mit gekühlten Lösungen und in gekühlten Zentrifugen. Als Proteaseinhibitor wurde immer eine 100 mM PMSF-Lösung verwendet.

Gesamtproteinextraktion:

Die Zellen wurden üN in Minimalmedium oder YPD angezogen. Es wurden je Kultur 5 OD Zellen geerntet und mit TE (Prot) gewaschen. Zu dem Zellpellet wurden ca 0,1 g Glasperlen, 100 µl SDS-Probenpuffer (1x) und 1 µl PMSF gegeben. Der Ansatz wurde im Ribolyser für 30 sec auf Stufe 5 geschüttelt. Die Proben wurden für 5 min auf 42 °C (Membranproteine) oder auf 95 °C erhitzt.

Membranproteinextraktion:

Die Zellen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 bis 2 angezogen und 40 OD geerntet. Die Zellen wurden mit TE (Prot) gewaschen, in 200 µl TE (Prot) resuspendiert, Glasperlen und 1 µl PMSF zugegeben und im Ribolyser für 30 sec bei Stufe 5 aufgebrochen. Zu der Suspension wurde 1 ml TE (Prot) gegeben und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 µl PMSF zugegeben und für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine und das Pellet die Membranproteine. Das Pellet wurde in 100 µl TE mit 1 µl PMSF aufgenommen.

2.2.3.3 TCA-Fällung von Proteinen

In einem Reaktionsgefäß wurden 200 µl 100 % TCA vorgelegt, 1 ml Proteinlösung zugegeben, am Vortex gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Dann wurde für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 200 µl 1 M Tris zugegeben, pelletiert, nochmal mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen und wieder pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet, 60 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und die Probe für 5 min auf 42 °C (Membranproteine) oder auf 95 °C erhitzt.

2.2.3.4 Auf trennung und Nachweis von Proteinen

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die Auf trennung von Proteinen erfolgte über 7,5 – 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli 1970). Die Proben wurden zum Laden mit SDS-Probenpuffer versetzt, auf 42 °C (Membranproteine) oder auf 95 °C erhitzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 – 200 V bis zum Auslaufen der blauen Markerbande.

Anfärben von Proteinbanden:

Die Gele wurden wie bei Sambrook (1989) beschrieben mit Coomassie Färbelösung gefärbt. Das Entfärben erfolgte im Anschluß mit 10 %iger Essigsäure. Die entfärbbten Gele wurden dann am Geltrockner getrocknet.

Westernblotanalyse:

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch bei 360 mA für 30 min auf Nitrocellulose übertragen und anschließend reversibel mit Ponceaurot S-Lösung gefärbt, um die Proteinspuren und den Standard mit einem Bleistift zu markieren. Zum Blockieren der Membran wurde sie für mindestens 30 min in Blockierungspuffer geschwenkt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in Blockierungspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde üN bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit Blockierungspuffer gewaschen und dann für 1 h der sekundäre peroxidasegekoppelte Antikörper zugegeben. Die Membran wurde nochmals dreimal für 10 min in Blockierungspuffer und zuletzt 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Peroxidase-Konjugate erfolgte durch Zugabe der Pierce Super Signal Pico Lösungen nach Vorschrift des Herstellers.

Antikörper gegen	Verdünnung	Bezugsquelle
c-myc	1:2000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Pma1p	1:5000	(Serrano 1983)
Wbp1p	1:2000	(Knauer und Lehle 1999)
Mnn9p	1:1000	(Stolz und Munro 2002)
Vam3p	1:3000	(Laage und Unger 2001)
Tim23p	1:500	(Bomer <i>et al.</i> 1997)
Por1p	1:2000	(Söllner <i>et al.</i> 1989)

2.2.3.5 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde nach Opekarova *et al.* (2002) durchgeführt. Für den Dichtegradienten wurde eine 32,8 %ige Saccharoselösung in Lysis-Puffer hergestellt, je 7,5 ml in Zentrifugationsrörchen gefüllt und üN bei -20 °C eingefroren. Die gefrorene Lösung wurde bei 4 °C wieder üN aufgetaut, wobei sich der Gradient einstellt. Es wurden Zellen in SD-Gal bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und die Membranen wie unter Kapitel 2.2.3.2 beschrieben isoliert. Die Proteinsuspension wurde statt in TE (Prot) in 100 µl Lysis-Puffer aufgenommen und oben auf den Gradienten geladen. Die Zentrifugation erfolgt im SW 41 Rotor bei 34000 rpm für 3 h und 4 °C. Von den Gradienten wurden 9 Fraktionen zu je 840 µl abgenommen und mit TCA gefällt. Von den Proteinen wurden je 10 µl auf SDS-Gele geladen und im Western Blot analysiert.

2.2.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Es wurden 2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,5 ml 150 mM EGTA (pH 7,0) und 25 µl Pepstatin-Lösung (1 mg/ml) gemischt und für 5 min geschüttelt. Dann wurden 2,5 ml PARA zugegeben und für weitere 45 min geschüttelt. Weitere Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit 1 ml PEMI (PEMI mit 1 µg/ ml Pepstatin) gewaschen, die Zellen anschließend für 20 bis 40 min mit der Verdau-Lösung inkubiert und währenddessen die Zellen im Mikroskop auf die Menge der Spheroplasten überprüft. Dann wurden die Spheroplasten geerntet, zweimal mit 1 ml PEMI gewaschen und in 50 µl 1 % (v/v) Triton X-100 für 1 min inkubiert. Die Spheroplasten wurden einmal mit 1 ml PEMI gewaschen und in 50 µl PEMI mit 2 % BSA für 20 min

inkubiert. Dann wurde der primäre Antikörper (c-myc-AK 1:20) zugegeben und für 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde dreimal mit 1 ml PEMI gewaschen, 20 µl des sekundären Antikörpers (anti-Kaninchen Tritc-Konjugat (CALBIOCHEM) 1:200 in 1 % BSA in PEMI) zugegeben und wieder für 1 h inkubiert. Die Spherozlasten wurden zweimal mit PEMI gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.3.7 Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität

Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte nach der Methode von Miller (1972). Die Zellen wurden üN in SD-Medium angezogen, am Morgen gewaschen, in die jeweiligen Medien, deren Einfluß auf die Expression untersucht werden sollte, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 überimpft und für 8 h bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit Wasser gewaschen und auf etwa 1 OD/ ml Zellen in Z-Puffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 800 µl zur Reaktion eingesetzt. Es wurden 60 µl Chloroform und 0,1 % SDS Lösung zugegeben, die Zellen für 10 sec am Vortex geschüttelt und der Ansatz für 5 min bei 30 °C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ ml in Z-Puffer) gestartet und die Probe bei 30 °C inkubiert, bis die Lösung gelblich wurde. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 400 µl 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und die Reaktionszeit festgehalten. Der Ansatz wurde für 10 min bei v_{max} abzentrifugiert und die Absorption bei 420 nm (OD₄₂₀) am Photometer bestimmt.

Die Berechnung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität}[\text{MillerU}] = \frac{\text{OD}_{600} * 1000}{\text{OD}_{420} * \text{Probenvolumen}[ml] * \text{Zeit}[min]}$$

2.2.3.8 CPY-Pulse-Chase

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Tu *et al.* (2000). Die Zellen einer üN-Kultur in SD-Medium (mit 10 mg Riboflavin/ l) wurden in 50 ml SD-Medium (mit 5 mg Riboflavin/ l) auf eine OD₆₀₀ von 0,2 überimpft und für 6 h bei 30 °C inkubiert. Es wurden 20 OD Zellen geerntet, mit Starvation Medium gewaschen, in 5 ml Starvation Medium überimpft und für 40 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, in 1 ml Starvation Medium aufgenommen, 5 mM DTT zugegeben und für 8 min bei RT inkubiert. Dann wurden 75 µl Cys/ Met ³⁵S Labeling Mix zugegeben und für weitere 12 min inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit 1 ml Chase Medium gewaschen und in 5 ml Chase Medium aufgenommen. Es wurde ein 1 ml Aliquot entnommen, die restliche Zellsuspension bei 30 °C inkubiert und nach 10, 30, 60 und 120 min weitere 1 ml Aliquots entnommen. Die Aliquots wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem N₂ eingefroren. Die Aliquots wurden dann auf Eis wieder aufgetaut, 100 µl 100 % TCA zugegeben, gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen und die Pellets luftgetrocknet. Zu den trockenen Pellets wurden je 100 µl Urea-boiling-Puffer, 0,3 g Glasperlen, je 1 µl 1M PMSF Lösung zugegeben und für 30 sek bei Stufe 5 am Ribolyser geschüttelt. Die Proben wurden für 5 min auf 60 °C erwärmt, 1 ml Tween-IP-Puffer zugegeben, abzentrifugiert und 950 µl der Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 1 µl eines α-CPY-Serums (Tu *et al.* 2000) zugegeben und üN bei 4 °C gerollt. Zu den Proben wurden je 70 µl einer Aufschämmung von Protein-A-Sepharose in Tween-IP-Puffer gegeben und für 3 h bei 4 °C gerollt. Die inkubierte Sepharose wurde zweimal mit je 1 ml

Tween-IP-Puffer, einmal mit 1 ml Tween-Urea-Puffer, einmal mit 1 ml SDS-Puffer und einmal mit 1ml PBS gewaschen. Dann wurden 40 μ l SDS-Ladepuffer zugegeben für 3 min auf 95 °C erhitzt, 20 μ l der Proteinsuspensionen auf ein 7,5 % SDS-Gel geladen und bei 150 bis 200 V elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, entfärbt und am Geltrockner getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde der Phospho-imagerscreen bzw. ein Röntgenfilm für maximal 14 d aufgelegt.

2.2.3.9 SDH-Aktivitätstest

Die Bestimmung der Succinatdehydrogenase- (SDH) Aktivität wurde nach Robinson *et al.* (1994) modifiziert. Die zum Test eingesetzten Stämme wurden in 10 ml YPD (mit 20 mg/ ml Riboflavin) üN angezogen, geerntet, mit Wasser gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in 250 ml YADE überimpft. Die Zellen wurden bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert, geerntet und 2-mal mit Wasser gewaschen. 40 OD Zellen wurden mit 200 μ l Homogenisierungspuffer (HP) gewaschen und erneut in 200 μ l HP resuspendiert. Dann wurden Glasperlen und 1 μ l PMSF zugegeben und die Zellen 2 mal 30 sec bei Stufe 5 im Ribolyser aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1 ml HP zu den Glasperlen, wurde gevortext und die Glasperlen bei 2000 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in einem SS34-Rotor-Becher gegeben in dem 6 μ l PMSF vorgelegt waren, die Glasperlen nochmals mit je 1 ml HP gewaschen und der Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Die Proteinsuspension wurde im SS34 Rotor bei 4 °C erst 10 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand in einen neuen Zentrifugenbecher gegeben und 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Das Pellet (enthielt die Mitochondrien) wurde mit 20 ml HP gewaschen und dann für 20 min bei 20200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 μ l 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7,6) (= Mitochondriensuspension) aufgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt.

Der Enzymtest wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Erst wurde 100 μ l Testpuffer (TP) vorgelegt, 40 μ l 0,5 % INT sowie 10 - 40 μ l 1 mM Succinat (Leerprobe ohne Succinat) zugegeben und auf ein Gesamtvolumen von 180 μ l mit Wasser aufgefüllt. Dann wurden 20 μ l der Mitochondriensuspension (Proteingehalt 6 - 10 mg/ ml) zugegeben und für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von 200 μ l 10 % TCA die Reaktion abgestoppt. Das entstandene wasserunlösliche Formazan wurde mit 900 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase bei 490 nm (gegen die Leerprobe) in einer Quarzküvette am Photometer vermessen.

2.2.3.10 Prolin-Oxidase-Aktivitätstest

Der Test wurde nach Brandriss und Magasanik (1979) modifiziert. Für den Prolin-Oxidase-Aktivitätstest wurden *E. coli* Zellen, die das Plasmid pMALc2x-PUT1 trugen in 2TY_{amp} angezogen, mit 1 mM IPTG induziert, geerntet, mit Wasser gewaschen und in flüssigem N₂ eingefroren. Die Zellen wurden wieder aufgetaut, in HEPES-Puffer zu 50 OD/ ml aufgenommen und mit Ultraschall aufgebrochen. Die Proteinsuspension wurde für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand im Test eingesetzt. Es wurden 5 - 20 μ l der Proteinlösung zu 200 μ l 10 % Prolin gegeben und mit HEPES-Puffer auf 450 μ l aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 4 min bei 30 °C (außer beim Blindwert) inkubiert, 50 μ l o-Amino-benzaldehyd-Lösung (6 mg/ ml in 20 % Ethanol) und 250 μ l 10 % TCA zugegeben, geschüttelt und für 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 1 min bei v_{max} abzentrifugiert und der Überstand bei 443 nm am Photometer gegen den Blindwert vermessen.

2.2.3.11 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an der Amylosesäule

Die *E. coli*, die das pMALc2x-Plasmid tragen, wurden in 2TY_{amp}-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft, bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert, dann mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit Wasser und einmal mit Säulenpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 15 ml Säulenpuffer aufgenommen und dreimal für 2 min bei einer Amplitude von 70 % mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 4 °C für 5 min im SS34-Rotor bei 40000 g zentrifugiert, der Überstand zu ca. 1 ml Amylosesäulenmaterial gegeben, das vorher mit Säulenpuffer äquilibriert wurde, und für 2 h bei 4 °C gerollt. Anschließend wurde die Suspension in eine 15 ml Säulenkartusche gegeben und der Durchlauf aufgehoben. Die Säule wurde sechsmal mit 1,5 ml Säulenpuffer gewaschen (W1-W6) und das mit dem MBP fusionierte Protein in 6 Aliquots zu je 1,5 ml mit Elutionspuffer eluiert. Je 10 µl der Aliquots wurden auf einem 10 %igem SDS-Gel analysiert. Die Quantifizierung des Proteins erfolgte im SDS-Gel durch einen Vergleich mit BSA bestimmter Konzentrationen.

2.2.4 Weitere Methoden

2.2.4.1 Auftrennung von Riboflavin, FMN und FAD mittels Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung von Riboflavin, FMN und FAD erfolgte auf Kieselgel-60-Platten. Das Laufmittel war eine Mischung aus Methanol, Toluol und Eisessig (75:20:5), die Detektion der Stoffe erfolgte durch Fluoreszenz im UV-Licht. Die Detektion der radioaktivmarkierten Substrate erfolgte durch Auflegen des Phosphoimager Screens. Die Extraktion von radioaktivem Riboflavin aus Bäckerhefe erfolgte mit Methanol bei 60 °C.

2.2.4.2 Aufnahmetests in Hefe

Die Aufnahmetests für Substrate, die über die Plasmamembran von *S. cerevisiae* transportiert werden, erfolgten mit radioaktiv markierten Substraten. Die Zellen wurden immer über Glasfaserfilter an einer Absaugbank geerntet, mit Wasser gewaschen und die Filter in Szintillationsbecher mit je 5 ml Szintillationscocktail gegeben. Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität wurde als Lichtblitze/min (cpm) im Szintillationszähler bestimmt.

2.2.4.2.1 Riboflavinaufnahme

Zur Bestimmung der Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae* wurden die Zellen zunächst in SD-Medium mit 20 mg/ ml Riboflavin üN angezogen. Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit SD-Medium ohne Riboflavin gewaschen und in SD-Medium ohne Riboflavin auf eine OD₆₀₀ von 0,2 überimpft und üN bei 30 °C inkubiert. Bei *S. pombe* wurden die Zellen in EMM (enthält kein Riboflavin und kein Thiamin) bei 30 °C auf eine OD₆₀₀ von ca. 1 inkubiert und zum Aufnahmetest eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, mit Wasser gewaschen und zu 40 OD/ ml in Wasser aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden zu 390 µl Aufnahmetestpuffer gegeben und für 1 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von 10 µl ¹⁴C markiertem Riboflavin gestartet und je 80 µl Aliquots zu

den Zeitpunkten 0,5; 2,5; 5; 7,5 und 10 min abgenommen. Die Aliquots wurden zu je 5 ml kaltem Wasser gegeben, das Wasser abgezogen und die Filter noch zweimal mit je 5 ml kaltem Wasser gewaschen.

2.2.4.2.2 Biotinaufnahme

Die Bestimmung der Biotinaufnahme erfolgte nach Stolz *et al.* (1999). Die Hefezellen wurden in SD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 1 angezogen, geerntet und erst mit kaltem Wasser und anschließend mit kaltem Citrat-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zu 10 OD/ ml in Citrat-Phosphat-Puffer aufgenommen und 1 ml der Zellsuspension zum Test eingesetzt. Die Suspension wurde 1 min bei 30 °C inkubiert, dann wurde Glucose zu einer Endkonzentration von 2 % zugegeben und eine weitere Minute inkubiert. Der Aufnahmetest wurde durch die Zugabe von 10 µl radioaktiv markiertem Biotin (0,4 mM) gestartet und es wurden je 100 µl Aliquots zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 2; 3; 4 und 5 min und ein Summenwert abgenommen. Die Aliquots wurden zu je 5 ml Wasser gegeben, das Wasser abgezogen und die Filter noch einmal mit je 5 ml Wasser gewaschen.

2.2.4.2.3 Glucoseaufnahme

Die Bestimmung der Glucoseaufnahme wurde nach Walsh *et al.* (1994) modifiziert. Die Hefezellen wurden in SD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,7 angezogen, geerntet und dreimal mit KP_i-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zu 5 OD/ ml in KP_i-Puffer aufgenommen und je 500 µl zum Test eingesetzt. Die Suspension wurde für 2 min bei 30 °C inkubiert und der Aufnahmetest durch Zugabe von 10 µl ¹⁴C-markierter Glucose (Endkonzentration 10 mM) gestartet. Es wurden je 100 µl Aliquots zu den Zeitpunkten 5, 60, 120, 180 und 240 Sekunden entnommen, die jeweils in 10 ml kaltes Wasser gegeben wurden und mit je 10 ml kaltem Wasser über die Glasfaserfilter gewaschen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Charakterisierung des Riboflavin-transporters in *Saccharomyces cerevisiae*

Da Riboflavintransport in Bäckerhefe (wie bereits unter Kapitel 1.2.2 beschrieben) nur in Riboflavinbiosynthesemutanten nachweisbar war, mussten zunächst Biosynthesemutanten hergestellt werden.

3.1.1 Gentechnischer Ansatz zur Identifizierung eines Plasmamembran-transporters für Riboflavin

Zur Identifizierung eines Plasmamembrantransporters für Riboflavin wurde zunächst das Wachstum von Bäckerhefestämmen mit defekter Riboflavinbiosynthese analysiert. Hierzu wurde der Wachstumsphänotyp von Stämmen, in denen das Gen für den vorletzten (*rib4Δ*) oder den letzten (*rib5Δ*) Schritt der Biosynthese deletiert war, auf SD-Medium mit verschiedenen Riboflavinkonzentrationen untersucht (im Folgenden als *rib*-Phänotyp bezeichnet). In Abbildung 3-2 ist zu sehen, dass *rib4Δ*-Stämme ab 2 mg/ l Riboflavin wachsen, während *rib5Δ*-Zellen 20 mg/ l Riboflavin zum Wachstum benötigen.

Der mildere Phänotyp der *rib4Δ* Mutanten ist vermutlich damit zu erklären, dass die von Rib4p vermittelte Reaktion unkatalysiert ablaufen kann, wenn auch langsamer (Kis *et al.* 2001). Obwohl beide Mutanten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten aufweisen, zeigen sie auf niedrigen Riboflavinkonzentrationen kein Wachstum. Bei genügend Riboflavin im Außenmedium wird dieser Phänotyp jedoch aufgehoben (siehe Abbildung 3-2).

Das Auftreten eines Wachstumphänotyps war die Voraussetzung für einen genetischen Screen. Die grundlegende Idee war, den Riboflavintransporter als Multicopy-Suppressor für diesen Phänotyp zu finden. Die *ribΔ*-Mutanten wurden mit einer Multicopy Genbank in YEp352 transformiert und auf Platten ausplattiert, auf denen diese Stämme, ohne komplementierendes Plasmid nicht wachsen können (*rib4Δ*-Mutanten auf SD-Platten mit 0,2 mg/ l Riboflavin und *rib5Δ*-Mutanten auf SD-Platten mit 2 mg/ l Riboflavin). Die Untersuchung der *rib4Δ*-Mutante wurde von M. Reich und J. Stoltz durchgeführt. Die auf diesen Platten gewachsenen Kolonien wurden erneut ausgestrichen und deren Plasmide isoliert. Diese wurden nach ihrem Muster in Restriktionsverdaus in Gruppen eingeordnet und die Plasmide, die auch in der Retransformation den Wachstumsphänotyp der Zellen

komplementiert haben, weiter untersucht. Plasmide, die den Zellen das Wachstum auf Platten ohne Riboflavin ermöglichten, wurden verworfen, da sie die Biosynthesegene *RIB4* bzw. *RIB5* enthielten. Dies wurde in Stichproben über PCR mit spezifischen Oligonucleotiden auch nachgewiesen. Die verbliebenen Plasmide (4 von 20000 Gesamttransformanden auf 20 mg/ l Riboflavin im *rib4Δ*- und 10 von 36000 Transformanden im *rib5Δ*-Hintergrund) wurden sequenziert. Jedes dieser komplementierenden Plasmide enthielt Fragmente derselben Region vom Chromosom XV und im kleinsten Fragment waren nur die Gene *MCH5* (mono-carboxylate transporter homologous 5) und *YOR305w* enthalten. Dieses Fragment ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

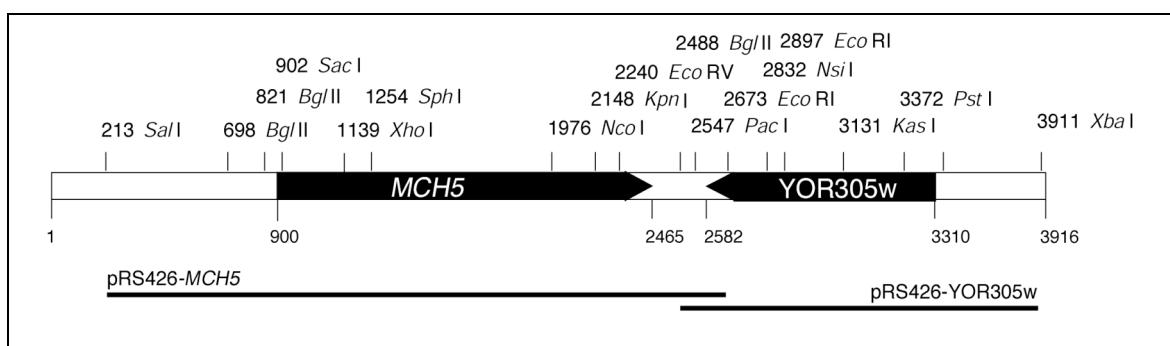


Abb. 3-1: Kleinstes Genbankfragment in YEplac352, das den *rib*-Phänotyp komplementiert. Das dargestellte Stück ist das kleinste Genbankinsert, das bei der Sequenzierung der den *rib*-Phänotyp komplementierenden Plasmide gefunden wurde. Die Balken unter den Genen zeigen die DNA-Stücke, die in den Vektor pRS426 subkloniert wurden.

3.1.1.1 Überexpression von *MCH5* komplementiert den Wachstumsphänotyp von *rib4Δ*- und *rib5Δ*-Mutanten

Um herauszufinden, ob *MCH5* oder *YOR305w* den *rib*-Phänotyp komplementiert, wurden die Gene aus dem in Abbildung 3-1 dargestellten Genbankstück herausgeschnitten und jeweils in den Multicopy-Vektor pRS426 kloniert. Die Zellen mit den jeweiligen Plasmiden wurden auf Platten mit verschiedenen Riboflavinkonzentrationen ausgebracht und die Komplementation des Wachstumsphänotyps der Zellen untersucht. Durch diesen Wachstumstest konnte gezeigt werden, dass nur die Überexpression von *MCH5* den Phänotyp der Biosynthesemutanten komplementieren kann. Sie ermöglichte sowohl den *rib4Δ*- als auch den *rib5Δ*-Mutanten das Wachstum auf SD-Medium mit 0,2 mg/ l Riboflavin. Allerdings konnten die Mutanten trotz der Überexpression von *MCH5* nicht auf Medium ohne Riboflavin wachsen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lieferte den ersten Hinweis darauf, dass Mch5p am Import und nicht an der Biosynthese von Riboflavin

beteiligt zu sein scheint. Die Expression von YOR305w veränderte das Wachstum in den *ribΔ*-Mutanten dagegen nicht. Ebenso hatte die Expression von *MCH5* im Wildtyp keinen Einfluss auf das Wachstum (siehe Abbildung 3-2).

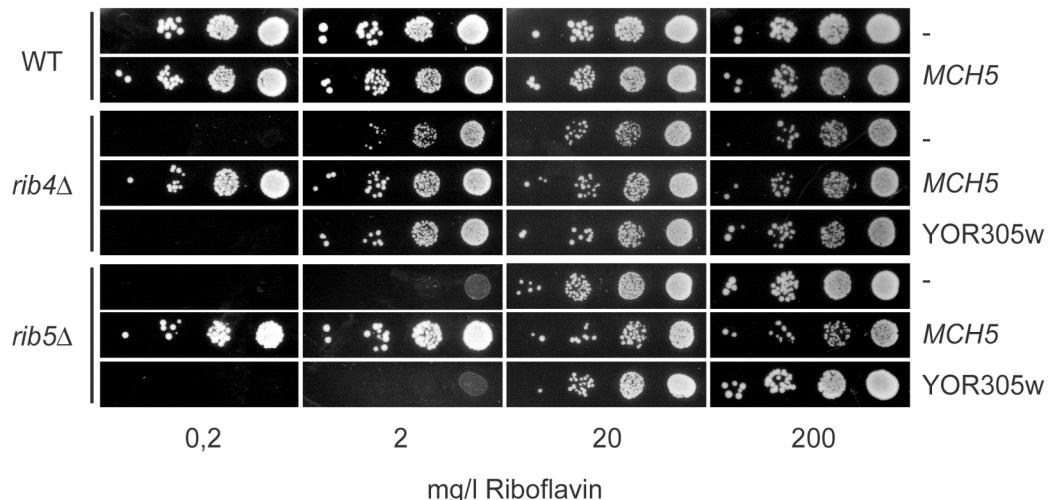


Abb. 3-2: Wachstumstests zur Komplementation des *rib*-Phänotyps durch *MCH5* und *YOR305w*. Die Stämme in diesem Wachstumstests haben den BY-Stammhintergrund. Von oben nach unten sind der Wildtyp (WT), die *rib4Δ*-Biosynthesemutante (*rib4Δ*) und die *rib5Δ*-Biosynthesemutante (*rib5Δ*) aufgetragen. Die Stämme tragen den leeren pRS426-Vektor (-), pRS426-MCH5 (*MCH5*) oder pRS426-YOR305w (*YOR305w*). Die Platten enthalten Riboflavin in den oben angegebenen Konzentrationen, kein Uracil und wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Mch5p zeigt in der Hydropathieanalyse zwölf Transmembrandomänen (siehe Abbildung 3-3). Dieses Strukturmerkmal weisen viele bekannte Transportproteine auf (Henderson 1993). *Mch5p* besteht aus 512 Aminosäuren, gehört zur Familie der MFS-Proteine und besitzt in *S. cerevisiae* fünf Homologe. Die Familie besteht aus *Mch1p*, *Mch2p*, *Mch3p*, *Mch4p* und *Mch5p*. Diese Proteine zeigen eine schwache Homologie zu den menschlichen Monocarboxylattransportproteinen MCT1, MCT2, MCT3, MCT4, MCT5, MCT6, MCT7 und MCT8 (monocarboxylate transporter), was zur Namensgebung der *Mch*-Proteine führte. Die menschlichen MCT1-7 Proteine transportieren Monocarboxylate, während MCT8 für den Transport von Thyroidhormonen zuständig ist (Bonen *et al.* 2006). Von Makuc *et al.* (2001) wurde untersucht, ob die Hefe *Mch*-Proteine an der Aufnahme von Mono-carboxylaten, wie Acetat, Pyruvat, Lactat und Propionat, beteiligt sind. Sie konnten jedoch für keines dieser Proteine eine Beteiligung am Transport von Monocarboxylaten zeigen. Bis jetzt konnte von keinem dieser Proteine die physiologische Funktion aufgeklärt werden.

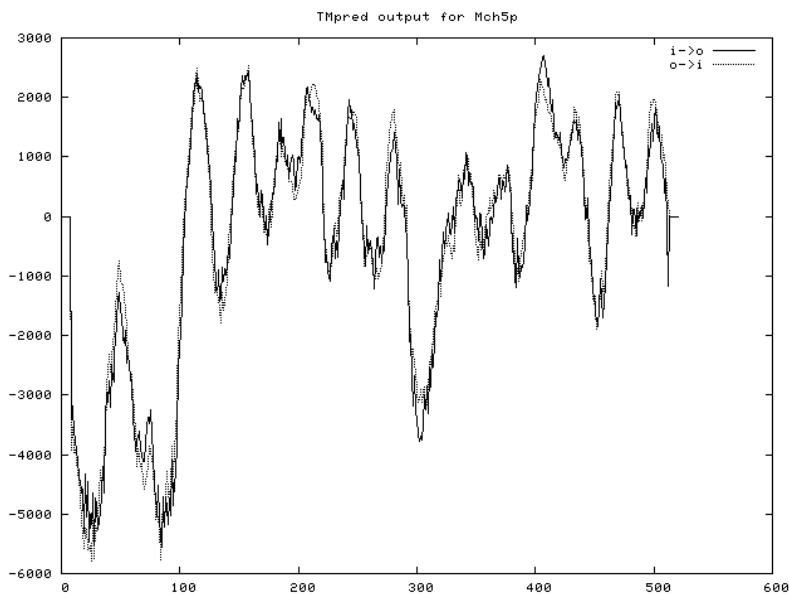


Abb. 3-3: Hydropathieplot von Mch5p aus TMpred.

In diesem Hydropathieplot werden 12 Transmembrandomänen für Mch5p vorhergesagt.

3.1.1.2 Die Überexpression von *MCH5* komplementiert auch andere *ribΔ*-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *MCH5* nicht nur den Wachstumsphänotyp in den *rib4Δ*- und *rib5Δ*-Mutanten komplementiert, wurden weitere *ribΔ*-Mutanten untersucht. Diese Mutanten, die in der haploiden EUROSCARF knockout-Sammlung nicht enthalten waren, wurden durch Sporulation und Tetradenanalyse (auf Platten mit 20 mg/ l Riboflavin) von heterozygoten Biosynthesemutanten hergestellt. Die so erhaltenen Stämme wurden mit pRS426-MCH5 transformiert und auf Medien mit verschiedenen Riboflavinkonzentrationen getestet (siehe Abbildung 3-4).

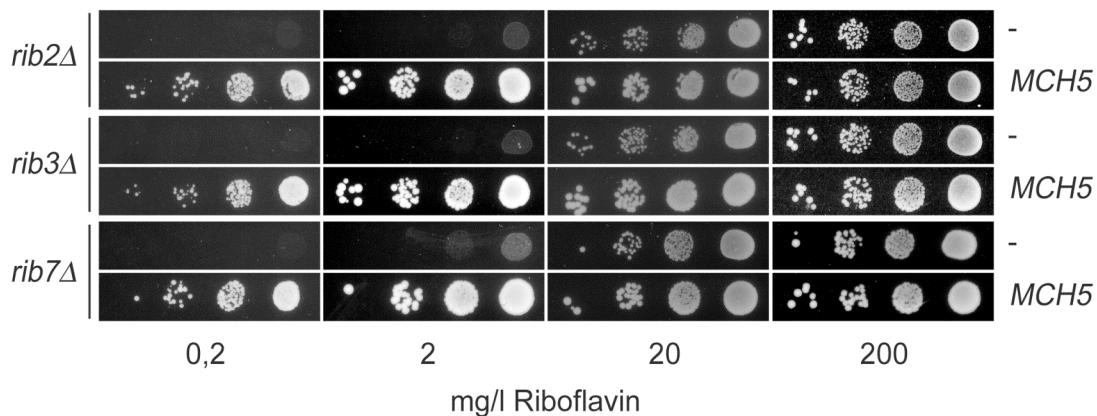


Abb. 3-4: Wachstumstests zur Komplementation des *rib*-Phänotyps durch *MCH5*. Die Stämme in diesem Wachstumstests haben den BY-Stammhintergrund. Von oben nach unten sind die *rib2Δ*-Biosynthesemutante (*rib2Δ*), die *rib3Δ*-Biosynthesemutante (*rib3Δ*) und die *rib7Δ*-Biosynthesemutante (*rib7Δ*) aufgetragen. Die Stämme tragen den leeren pRS426-Vektor (-) oder den Vektor pRS426-MCH5 (*MCH5*). Die Platten enthalten Riboflavin in den oben angegebenen Konzentrationen, kein Uracil und wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die *rib2Δ*-, *rib3Δ*- und *rib7Δ*-Biosynthesemutanten zeigten den gleichen Wachstumsphänotyp wie die *rib5Δ*-Mutanten (Wachstum ab 20 mg/ 1 Riboflavin). Die Überexpression von *MCH5* schwächte bei allen getesteten *rib*-Mutanten den Wachstumsphänotyp ab. Dies zeigt, dass Mch5p keinen Einfluss auf einen bestimmten Schritt der Riboflavinbiosynthese hat. Das Gegenteil ist der Fall - die Überexpression von *MCH5* verhilft allen getesteten *ribΔ*-Mutanten zu besserem Wachstum.

3.1.1.3 Verstärkung des Wachstumsphänotyps durch die Deletion von *MCH5* in den Riboflavinbiosynthesemutanten

Da gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von *MCH5* in *ribΔ*-Mutanten zu einer Verminderung des Riboflavinbedarfs führt wurde im Folgenden untersucht, welchen Effekt die Deletion von *MCH5* hat. Dazu wurden zunächst *ribΔ mch5Δ*-Doppelmutanten hergestellt. Das Wachstum der Doppelmutanten wurde auf Medien mit verschiedenen Riboflavinkonzentrationen mit dem Wachstum von WT und *ribΔ*-, *mch5Δ*- und *ribΔ mch5Δ*- Mutanten verglichen (siehe Abbildung 3-5).

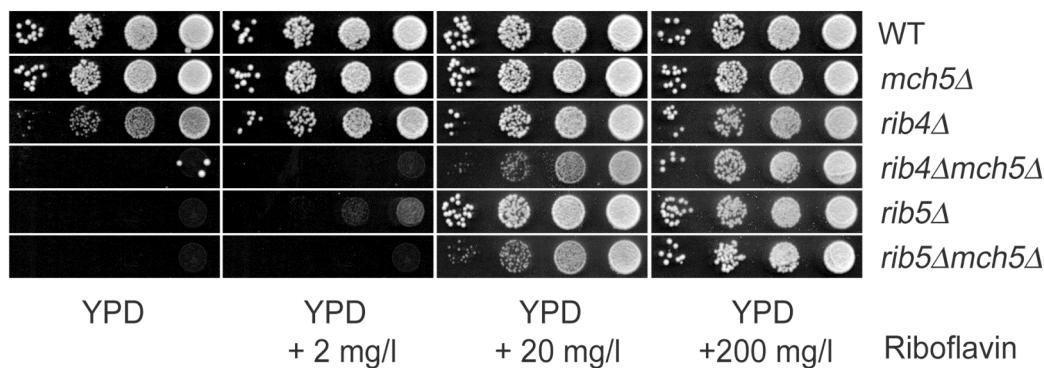


Abb. 3-5: Vergleich des Wachstums vom WT, der *mch5Δ*-Mutante, der *rib*-Mutanten und der *ribΔ mch5Δ*-Doppelmutanten. Der Wachstumstest wurde auf YPD durchgeführt. Die Stämme in diesem Wachstumstests haben den BY-Stammhintergrund. Die Platten enthalten die oben angegebenen Riboflavinkonzentrationen zusätzlich zu dem Riboflavin, das bereits in YPD enthalten ist. Sie wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Wie in Abbildung 3-5 zu sehen ist, zeigte der Stamm mit der Deletion von *MCH5* keinen höheren Riboflavinbedarf als der WT. Eine zusätzliche Deletion von *MCH5* in den untersuchten *rib*-Mutanten führte jedoch zu einem deutlich schlechteren Wachstum auf YPD mit niedrigeren Riboflavinkonzentrationen. Erstaunlicherweise zeigten sowohl *rib4Δ*- als auch *rib5Δ*-Mutanten mit der zusätzlichen Deletion von *MCH5* den gleichen Riboflavinbedarf, obwohl sich der Bedarf in den Einzelmutanten deutlich unterscheidet. Der Grund hierfür ist unbekannt. Mit diesem Experiment wurde bewiesen, dass die Überexpression von

MCH5 zu einem verringerten Riboflavinbedarf bei *ribΔ*-Mutanten führt. Dies ist mutmaßlich durch eine verbesserte Aufnahme von Riboflavin durch Mch5p bedingt. Im Gegensatz dazu führte die Deletion des *MCH5*-Gens in den *ribΔ*-Stämmen zu deutlich erhöhtem Riboflavinbedarf. Vermutlich konnten die Zellen bei hohen Riboflavin-Konzentrationen wachsen, weil das Riboflavin in diesen sehr hohen Konzentrationen passiv über die Plasmamembran diffundieren kann. Es ist in Abbildung 3-2 zu sehen, dass die *rib4Δ*-Mutante einen deutlich schwächeren Wachstumsphänotyp als die anderen Mutanten zeigte. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente hauptsächlich mit *rib5Δ*-Mutanten durchgeführt.

3.1.1.4 Beteiligung der *MCH1-MCH4*-Gene am riboflavinabhängigen Wachstum

Mch5p gehört zu einer Familie von fünf Proteinen (Makuc *et al.* 2001) und ist Mch4p am ähnlichsten (45 % Identität). Die Proteine dieser Familie sind alle vergleichsweise schwach exprimiert, wobei basierend auf Promotor-*lacZ*-Fusionen Mch5p die stärkste Expression (gefolgt von Mch4p) zeigt (Makuc *et al.* 2001). Um die Funktion der *MCH1-MCH4*-Gene zu überprüfen, wurden deren ORFs mit ihren eigenen Terminatoren hinter den Promotor des *GAL1*-Gens (*GAL*-Promotor) in das Plasmid pYES2 kloniert. Die Expression der jeweiligen Gene kann durch Galactose induziert und durch Glucose reprimiert werden. Zunächst wurde analysiert, ob die Überexpression der *MCH1-MCH4*-Gene das Wachstum der *rib5Δ*-Stämme auf niedrigeren Riboflavinkonzentrationen ermöglicht. Dazu erfolgte die Untersuchung des Wachstums der Stämme mit den Plasmiden auf SD-Medium mit Glucose und auf SD-Medium mit Galactose bei verschiedenen Riboflavinkonzentrationen (siehe Abbildung 3-6).

Dieser Test zeigte, dass lediglich die Überexpression von *MCH5* das Wachstum von *rib5Δ*-Mutanten auf niedrigeren Riboflavinkonzentrationen ermöglichte. Da auf SD-Medium mit Glucose keine Komplementation des Phänotyps durch pYES-MCH5 zu sehen war, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von *MCH5* für die Funktion als Multicopy-Suppressor notwendig ist.

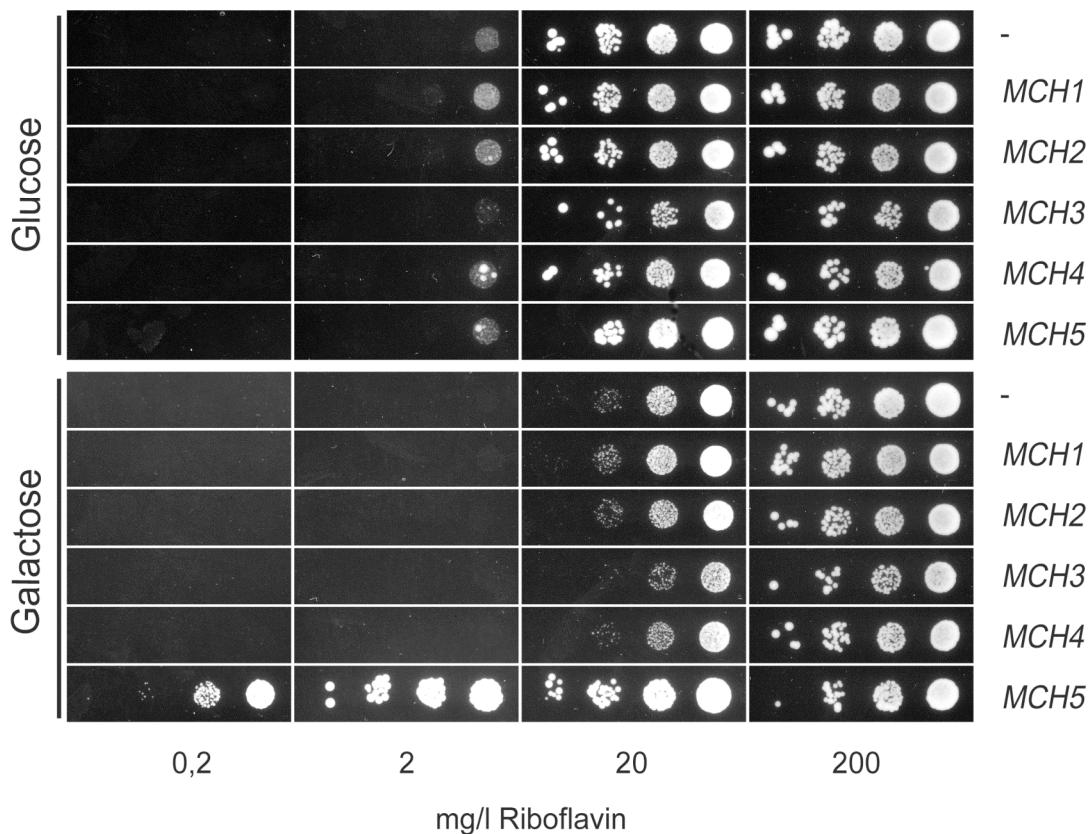


Abb. 3-6: Wachstumstests zur Komplementation des *rib*-Phänotyps durch *MCH1*-*MCH5*. Bei den Stämmen in diesem Wachstumstests handelt es sich um *rib5Δ*-Biosynthesemutanten im BY-Stammhintergrund. Die Stämme tragen den leeren pYES2-Vektor (-), pYES2-*MCH1* (*MCH1*), pYES2-*MCH2* (*MCH2*), pYES2-*MCH3* (*MCH3*), pYES2-*MCH4* (*MCH4*) oder pYES2-*MCH5* (*MCH5*). In diesen Vektoren sind die Gene mit ihrem eigenen Terminator unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors enthalten. Die Stämme wurden auf SD-Platten mit Glucose bzw. Galactose gestempelt. Die Platten enthalten Riboflavin in den oben angegebenen Konzentrationen und kein Uracil. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Um abzusichern, dass die *MCH1*-*MCH4*-Gene keine Rolle bei diesem Wachstumsphänotyp haben, wurde im *mch1Δ*-, *mch2Δ*-, *mch3Δ*-, *mch4Δ*- bzw. *mch5Δ*- Stammhintergrund zusätzlich *RIB5* deletiert. Diese Doppelmutanten wurden ebenfalls auf Medien mit verschiedenen Riboflavinkonzentrationen getestet (siehe Abbildung 3-7).

Es konnte festgestellt werden, dass die *rib5Δ mch2Δ*-Doppelmutante auf allen Riboflavinkonzentrationen ein schlechteres Wachstum zeigte. Dieser Phänotyp trat jedoch nur bei der *mch2Δ*-Mutante aus der EUROSCARF-Stammsammlung auf und war in einer Doppelmutante, in der ein Teil des *MCH2*-ORFs durch *LEU2* ersetzt wurde, nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Außer der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante zeigte keine der anderen Doppelmutanten eine Verschlechterung des Wachstums bei niedrigen Riboflavinkonzentrationen.

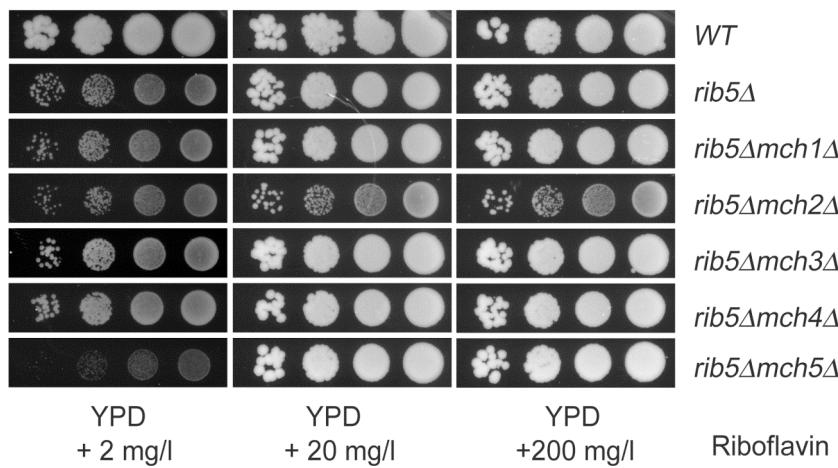


Abb. 3-7: Vergleich des Wachstums vom WT, der *rib5Δ*-Mutante und der *rib5Δ mchΔ*-Doppelmutanten. Der Wachstumstest wurde auf YPD durchgeführt. Die Stämme in diesem Wachstumstest haben den BY-Stammhintergrund. Die Platten enthalten die oben angegebenen Riboflavin-Konzentrationen zusätzlich zum bereits in YPD enthaltenen Riboflavin. Die Zellen wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Um mögliche synergistische Wirkungen der Gene untereinander auszuschließen wurde untersucht, ob eine Deletion von *MCH1-MCH5* zu einem verstärkten Wachstumsdefekt führt. Die *mch1-mch5Δ*-Fünffachmutante wurde von Makuc *et al.* (2001) zur Verfügung gestellt und hatte den CEN.PK-Stammhintergrund. Um stammabhängige Wachstumsunterschiede ausschließen zu können, wurden im CEN.PK-Stammhintergrund *RIB5* bzw. *RIB5* und *MCH5* deletiert. In der *mch1-mch5Δ*-Mutante wurde zusätzlich *RIB5* deletiert. Das Wachstum dieser Stämme wurde auf YPD mit unterschiedlichen Riboflavin-Zusätzen untersucht (siehe Abbildung 3-8).

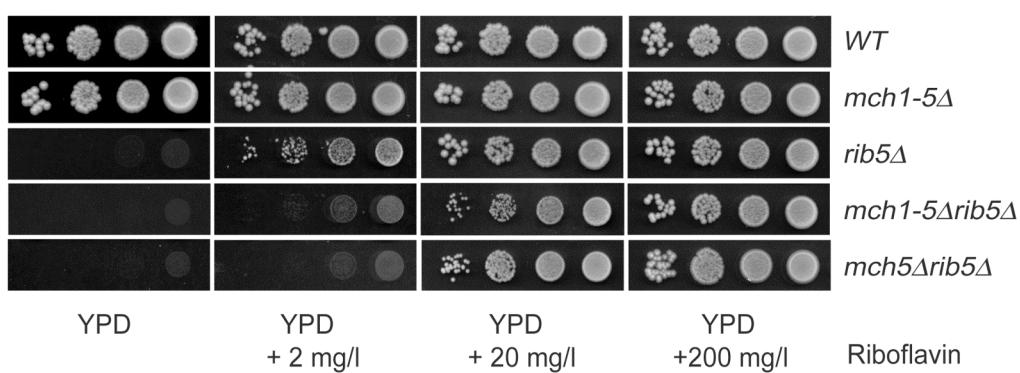


Abb. 3-8: Vergleich des Wachstums vom WT, der *mch1-5*-Fünffachmutante, der *rib5Δ*-Mutante, der *rib5Δ mch1-5Δ*-Sechsfachmutante und der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante. Der Wachstumstest wurde auf YPD durchgeführt. Die Stämme in diesem Wachstumstest haben den CEN.PK-13D-Stammhintergrund. Die Platten enthalten die oben angegebenen Riboflavin-Konzentrationen zusätzlich zum bereits in YPD enthaltenen Riboflavin. Die Zellen wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Das riboflavinabhängige Wachstum der *rib5Δ mch1-5Δ*-Sechs fachmutante gleicht dem der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante. Nachdem auch in diesen Mutanten kein stärkerer Wachstumsphänotyp zu sehen war, können synergistische Wachstumsdefekte durch die homologen Gene ausgeschlossen werden. Dies zeigt, dass *MCH5* eine Funktion im Riboflavinstoffwechsel besitzt, die den anderen *MCH*-Genen fehlt.

3.1.1.5 Auftreten von *rib**-Mutanten

Im Verlauf der Experimente traten immer wieder Einzelkolonien auf, die trotz ihres *rib4Δ*-Genotypes auf für den Stammhintergrund zu niedrigen Riboflavinkonzentrationen wieder besser wachsen konnten (siehe Abbildung 3-2). Dieses Verhalten wurde von Lesuisse *et al.* (2005) bereits beobachtet und lässt vermuten, dass dies durch Suppressormutationen außerhalb des Gens verursacht wird. Zunächst konnte dieses Phänomen (im Folgenden als *rib**-Mutanten bezeichnet) nur bei den *rib4Δ*-Mutanten gesehen werden, jedoch wurde bei genauerer Untersuchung anderer *ribΔ*-Mutanten gezeigt, dass dieser *rib**-Phänotyp in allen getesteten *ribΔ*-Mutanten auftritt (siehe Abbildung 3-2, 3-4 und 3-6). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde festgestellt, dass der *rib**-Phänotyp in allen untersuchten Biosynthesemutanten mit ähnlicher Häufigkeit auftritt (A. Spitzner und J. Stolz, unveröffentlichte Daten). Das häufige Auftreten von *rib**-Mutanten kann gegebenenfalls dadurch erklärt werden, dass die Riboflavinbiosynthese an der Entgiftung von 8-Oxo-GTP (einem spontan auftretenden, durch reaktive Sauerstoffspezies verursachten mutagenen Stoff) beteiligt ist (Boretsky *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 1998). Die Anreicherung von 8-Oxo-GTP in den Zellen kann somit zu einer erhöhten Mutationsrate führen. Der genaue Mechanismus, der den *rib**-Phänotyp verursacht, ist noch unbekannt. Um zu verhindern, dass Experimente mit *rib**-Mutanten durchgeführt werden, wurden die Zellen stets auf Platten mit ausreichend hoher Riboflavinkonzentration vorinkubiert. Es wurden außerdem nur Zellen für die Experimente eingesetzt die kein schnelleres Wachstum aufwiesen.

3.1.2 Überprüfung FAD abhängiger Reaktionen in WT-, *rib5Δ*- und *rib5Δ mch5Δ*-Stämmen

Obwohl die oben beschriebenen Experimente viele Hinweise darauf lieferten, dass Mch5p der Riboflavintransporter in der Plasmamembran ist, konnte in Biosynthesemutanten, die *MCH5* überexprimieren, keine Aufnahme von radioaktiv markiertem Riboflavin über die Plasmamembran gemessen werden. Daher wurde untersucht, ob Mch5p in intrazellulären Membranen vorkommt.

3.1.2.1 Reifungsdefekte der Carboxypeptidase Y (CPY) in den *mch5Δ*-Mutanten

Von Tu *et al.* wurde gezeigt, dass die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen von der Riboflavinbiosynthese abhängig ist (Tu *et al.* 2000). Sie wird durch die im ER-Lumen lokalisierte FAD abhängige Oxidase Ero1p katalysiert (Frands und Kaiser 1998; Tu und Weissman 2002). Eine verminderte Kapazität zur Oxidation von Cystein zu Cystin in Proteinen, durch reduzierende Agentien wie DTT, führt zu einer verzögerten Freisetzung von disulfidbrückentragenden Proteinen aus dem ER (Tu *et al.* 2000). Die Carboxypeptidase Y (CPY), eine vakuolare Protease mit fünf Disulfidbrücken, ist ein geeignetes Protein um die Proteinreifung im ER zu verfolgen. Die CPY wird bei der Prozessierung vom ER (prä-Form (p1)) über den Golgi (pro-Form (p2)) in die Vakuole (reife-Form(m)) mehrfach modifiziert. Zur Untersuchung der Reifung der CPY wurden die Zellen zunächst mit einer [³⁵S]-markierte Cystein-Methionin Mischung inkubiert und dann mit unmarkiertem Cystein und Methionin versetzt. Die Geschwindigkeit der CPY-Reifung kann hiernach anhand der Menge des eingebauten radioaktiven Cysteins verfolgt werden. Die Lokalisation der jeweiligen Form der CPY in den verschiedenen Zellkompartimenten, lässt sich aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der oben genannten Formen im SDS-Gel verfolgen (Frands und Kaiser 1998; Tu *et al.* 2000; Tu und Weissman 2002). Die Detektion der radioaktiv markierten CPY erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms oder eines Phosphoimagerscreens. Die Reifung der CPY wurde in WT-, *rib5Δ*- und *rib5Δ mch5Δ*-Zellen untersucht (siehe Abbildung 3-9).

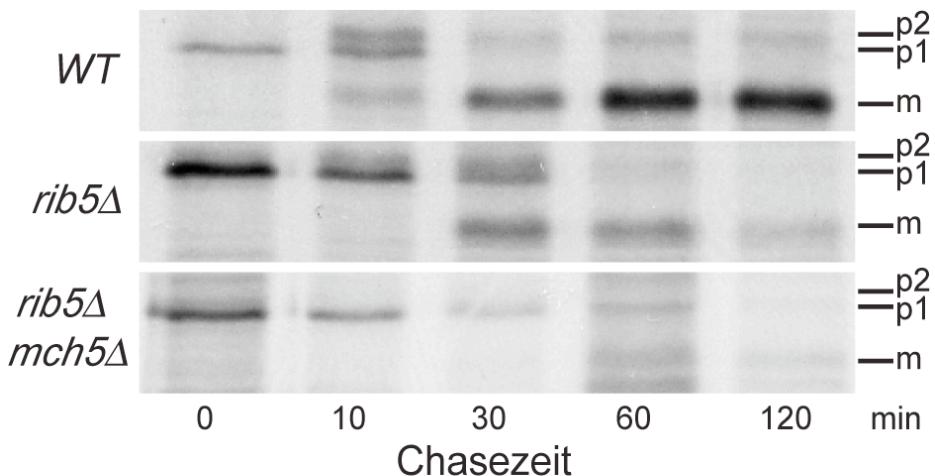


Abb. 3-9: Pulse-Chase Experiment zur Reifung der Carboxypeptidase Y (CPY) in WT, der *rib5Δ*-Mutante und der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante. Die Zellen mit dem angegebenen Genotyp wurden für 8 min in SD-Medium mit 5 mM DTT vorinkubiert, dann eine [³⁵S]-markierte Cystein-Methionin Mischung zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in frisches Medium mit je 10 mM unmarkiertem Cystein und Methionin gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots abgenommen und mit einem CPY-Antikörper immunpräzipitiert. Es sind die ER-Form (p1), die Golgi-Form (p2) und die reife Form in der Vakuole (m) angegeben.

Das Pulse-Chase Experiment zeigte, dass die CPY in WT-Zellen sehr schnell reift. Hier waren bereits nach 10 min nach dem Entfernen des DTT reife Formen des Proteins und eine deutliche Bande der Golgiform zu sehen. Zu späteren Zeitpunkten waren nur noch Spuren der p1- und p2-Form zu sehen, während sich die m-Form wie erwartet anreichte. In den *rib5Δ*-Mutanten lagen nach 30 min ungefähr gleichviele m- sowie p1- und p2-Formen vor und nach 60 min war hauptsächlich die reife Form zu sehen. Jedoch konnte hier insgesamt viel weniger der m-Form detektiert werden als im WT. Die Reifung der CPY war in *rib5Δ mch5Δ* im Vergleich zu *rib5Δ* weiter verlangsamt. Hier lag nach 30 min noch keine reife Form vor. Auch nach 120 min waren kaum reife Formen zu sehen. Zu keinem Zeitpunkt konnte in dieser Mutante die Golgi-Form (p2) gesehen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass nur richtig gefaltete Proteine das ER verlassen können und dies somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Mutante ist. Die Menge der pro-Form liegt in dieser Mutante wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. Bei der Doppelmutante reift die CPY wahrscheinlich kaum, sondern wird eher degradiert, da in der Doppelmutante noch weniger der reifen Form vorlag. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Reifung der CPY, ein FAD-abhängiger Prozess im ER, durch die Deletion von *RIB5* verlangsamt ist und durch die zusätzliche Deletion von *MCH5* noch stärker verzögert wird.

3.1.2.2 Bestimmung der Succinatdehydrogenase (SDH) Aktivität der *mch5Δ*-Mutanten

Um zu sehen, ob auch andere FAD-abhängige zelluläre Prozesse durch die Deletion von *MCH5* betroffen sind, wurde in WT-, *rib5Δ*- und *rib5Δ mch5Δ*-Zellen ein Succinatdehydrogenase (SDH)-Test durchgeführt. Bei der SDH handelt es sich um ein FAD-abhängiges, mitochondrielles Enzym im Zitronensäurezyklus. Mit diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob die Deletion von *RIB5* bzw. von *RIB5* und *MCH5* die Aktivität der SDH beeinflusst. Das Prinzip des SDH-Aktivitätstests ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

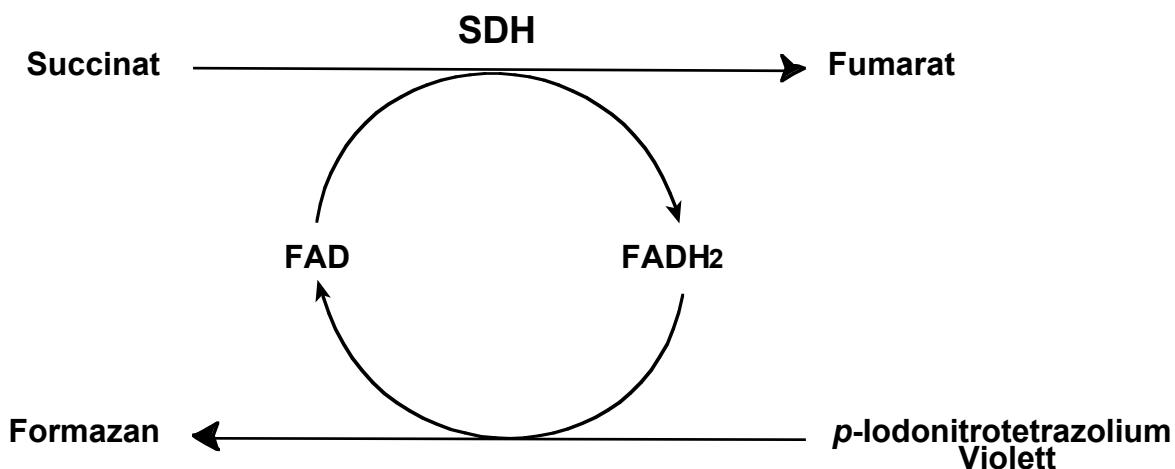


Abb. 3-10: Prinzip des SDH-Aktivitätstests. Die SDH katalysiert die Umsetzung von Succinat zu Fumarat, wobei die dabei entstehenden Wasserstoffatome auf FAD übertragen werden. Das daraus entstandene FADH₂ reduziert das Substrat *p*-Iodotetrazolium Violett zu dem wasserunlöslichen roten Formazan. Die Menge des gebildeten Farbstoffs kann nach Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat bei 490 nm am Photometer bestimmt werden.

Die Ergebnisse des SDH-Tests sind in Abbildung 3-11 dargestellt. Die SDH-Aktivität reduzierte sich durch die Deletion von *RIB5* auf ca. 60% und durch zusätzliche Deletion von *MCH5* auf ca. 20% der Aktivität der WT-Zellen. Obwohl die Tests insgesamt schlecht reproduzierbar waren, was zu hohen Standardabweichungen (siehe Fehlerbalken in Abbildung 3-11) führte, war doch in jeder einzelnen Versuchsreihe die SDH-Aktivität in WT-Zellen stets höher als in *rib5Δ*-Zellen. In den *rib5Δ mch5Δ*-Mutanten war die SDH-Aktivität immer deutlich niedriger als in den WT- und *rib5Δ*-Zellen.

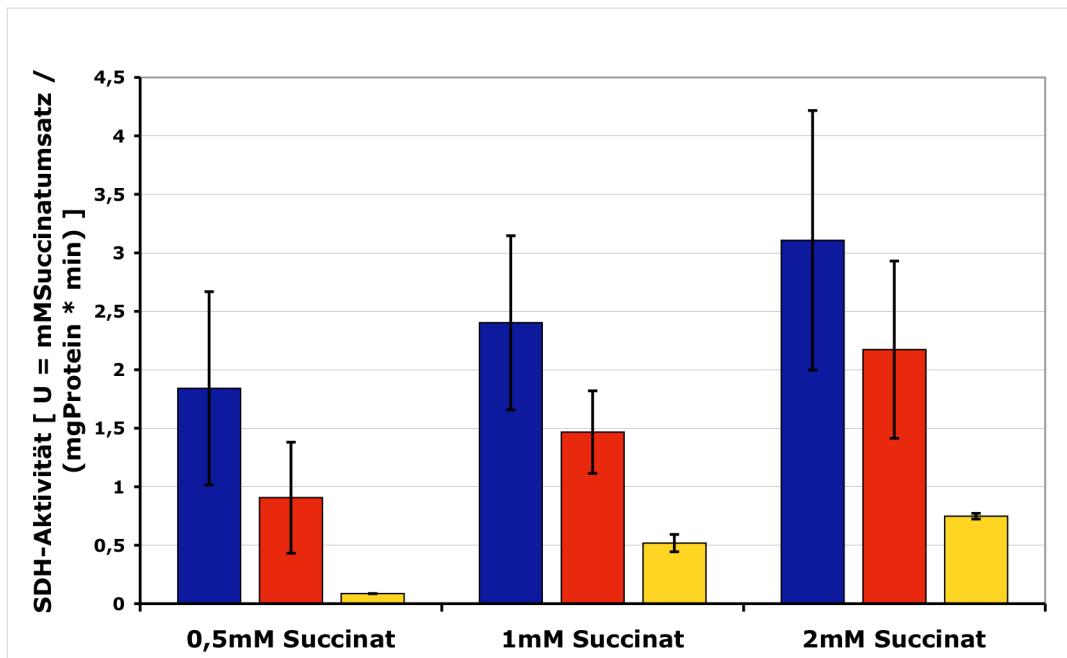


Abb. 3-11: SDH-Aktivität in WT (blau), der *rib5Δ*-Mutante (rot) und der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante (gelb). Von Zellen mit dem angegebenen Genotyp wurde die Mitochondrienmembran isoliert und die Umsatzgeschwindigkeit von *p*-Iodotetrazolium-Violett zu Formazan untersucht. Der Test wurde mit den jeweils angegebenen Succinatkonzentrationen durchgeführt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen von jeweils drei Bestimmungen.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass mehrere FAD-abhängige zelluläre Prozesse durch die Deletion von *RIB5* verlangsamt wurden. Durch die zusätzliche Deletion von *MCH5* wurden diese Verzögerungen noch deutlich verstärkt. Diese Beobachtungen machen es unwahrscheinlich, dass Mch5p am Riboflavin- bzw. FAD-Transport über intrazelluläre Membranen beteiligt ist. Sie sind weitere Hinweise darauf, dass Mch5p am Transport von Riboflavin über die Plasmamembran beteiligt ist.

3.1.3 Lokalisation von Mch5p in *S. cerevisiae*

Zur Bestimmung der Lokalisation von Mch5p wurden verschiedene GFP-markierte Versionen des Proteins hergestellt. Die C-terminal-GFP-markierte Version von Mch5p führte zu einer Inaktivierung des Proteins und wies eine ER-Lokalisation des Proteins auf (J. Stolz, Daten nicht gezeigt). Dies führte zu dem Schluss, dass eine C-terminale GFP-Markierung den Export des Proteins aus dem ER verhindert. Mit einer N-terminalen GFP-Markierung blieb die Funktionalität des Proteins erhalten, jedoch konnte im Fluoreszenzmikroskop nur diffuse Fluoreszenz detektiert werden. Durch Überprüfung im Westernblot mit GFP-Antiserum konnte gezeigt werden, dass die Zellen viel freies GFP (27 kDa) enthielten, während kaum GFP-Mch5p-Fusionsprotein bei 83 kDa zu beobachten war.

(Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde an Mch5p das deutlich kleinere 9-myc-Epitop (in dem Plasmid pRS316 (CEN, *URA3*) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors) an den N-Terminus fusioniert. Dieses Konstrukt war im Komplementationstest auf Galactose-Platten funktionell und konnte im Westernblot als ungespaltenes Protein (bei 68 kDa) nachgewiesen werden. Es wurde in dieser Form zur Bestimmung der Lokalisation zum einen in einem Saccharosedichthegradienten und zum anderen durch indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Die Saccharosedichthegradienten-Zentrifugation erfolgte nach der von Opekarova *et al.* (2002) beschriebenen Methode (siehe Abbildung 3-12). Mch5p konnte vorwiegend in der obersten und der untersten Fraktion des Dichtegradienten gefunden werden. Dieses Verteilungsmuster war mit dem der Plasmamembran-ATPase Pma1p identisch. Mch5p kofraktionierte nicht mit dem ER-lokalisiertem Wbp1p, was ein weiterer Hinweis ist, dass das C-terminal GFP markierte Mch5p deshalb nicht funktionell war, weil es das ER nicht verlassen konnte. Von Makuc *et al.* (2001) wurde beschrieben, dass Mch3p in der mitochondriellen Membran lokalisiert ist. Jedoch kann diese Lokalisation für Mch5p ausgeschlossen werden, da auch die mitochondriellen Membranproteine Tim23p und Por1p eine komplett andere Verteilung im Dichtegradienten zeigten als Mch5p.

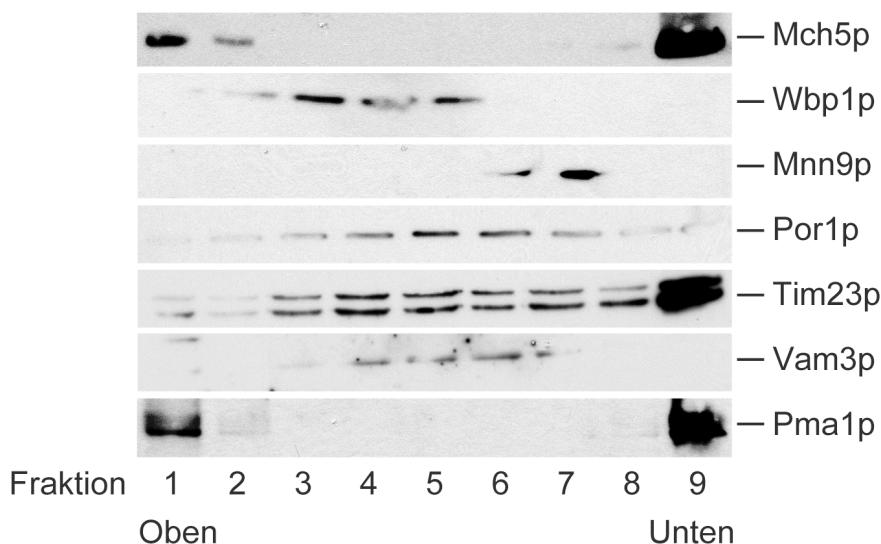
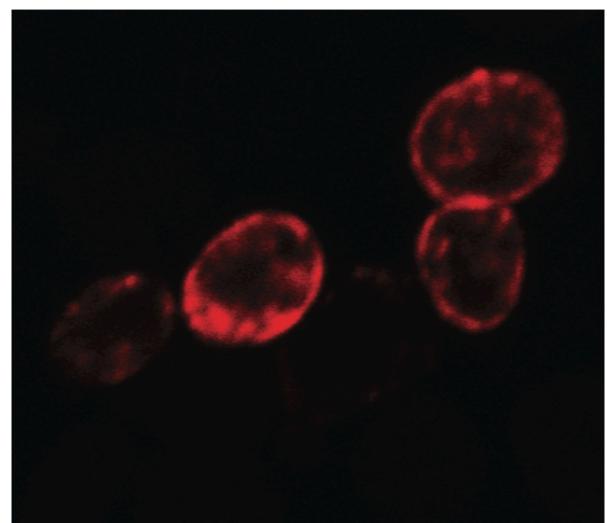


Abb. 3-12: Lokalisatzion von Mch5p im Saccharosedichthegradienten. Membranen von BY4741, in dem 9-myc-markiertes Mch5p exprimiert wurde, wurden durch Saccharosedichthegradienten-Zentrifugation aufgetrennt, die daraus erhaltenen Fraktionen auf 10 %igen SDS-Gelen elektrophoretisch analysiert und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Diese Membranen wurden mit Antikörpern gegen Wbp1p (ER-Membranprotein (Knauer und Lehle 1999)), Mnn9p (Golgi-Membranprotein (Stolz und Munro 2002)), Por1p (Protein der äußeren mitochondriellen Membran (Söllner *et al.* 1989)), Tim23p (Protein der inneren mitochondriellen Membran (Bomer *et al.* 1997)), Vam3p (vakuoläres Membranprotein (Laage und Unger 2001)), Pma1p (Plasmamembran-Protein (Serrano 1983)) oder dem polyklonalen anti-myc Serum (9myc-Mch5p) dekoriert.

Zur Bestätigung dieses Befundes wurde die Lokalisation von Mch5p zusätzlich durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden zunächst auf SD-Medium mit Galactose angezogen. Danach wurden sie, um die zellulären Prozesse zu inhibieren, fixiert und aus den Zellen Spheroplasten hergestellt. Diese wurden mit dem polyklonalen Antikörper gegen das myc-Epitop inkubiert und dieser wiederum mit einem Tritc-konjugiertem sekundären Antikörper markiert. Das Konjugat wurde durch Tritc-Anregung bei 546 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3-13).

Abb. 3-13: Lokalisatzion von Mch5p durch indirekte Immunfluoreszenz. Fixierte BY4741-Spheroplasten wurden mit myc-Antiserum (1:20) dekoriert, gewaschen und im Anschluss mit Tritc-Antikörperkonjugat (1:200) inkubiert. Die Zellen wurden im konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert und photographiert.



Hierbei wurde die Lokalisation von Mch5p in der Plasmamembran der Hefezellen sichtbar. Zusammen mit der Saccharosedichthegradientenzentrifugation konnte damit eindeutig gezeigt werden, dass Mch5p in der Plasmamembran lokalisiert ist.

3.1.4 Überexpression von **MCH5** steigert die Riboflavinaufnahme

Alle bisher gezeigten Daten weisen darauf hin, dass Mch5p ein Plasmamembrantransporter für Riboflavin ist. Es war jedoch schwierig, Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae* zu zeigen. Dies ist ein Beispiel dafür, dass bei der Untersuchung von Vitamintransportproteinen Wachstumstests deutlich sensitiver als Aufnahmetests sind. Diese Beobachtungen konnten vorher bereits in Untersuchungen zur Pyridoxin- und Biotinaufnahme gemacht werden (Stolz 2003; Stolz und Vielreicher 2003).

3.1.4.1 Transport von Riboflavin in *S. cerevisiae*

Um eine Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae* messen zu können, wurde das Standardprotokoll systematisch abgeändert. Dazu wurden *rib4Δ*-Zellen mit stark überexprimiertem *MCH5* über Nacht in riboflavinfreiem Medium inkubiert, um sie an intrazellulärem Riboflavin zu verarmen. Daraufhin war es möglich, in diesen Zellen die Aufnahme von [¹⁴C]-Riboflavin zu messen. Der *rib4Δ*-Stamm mit leerem Plasmid zeigte nur Hintergrundaktivität (siehe Abbildung 3-14).

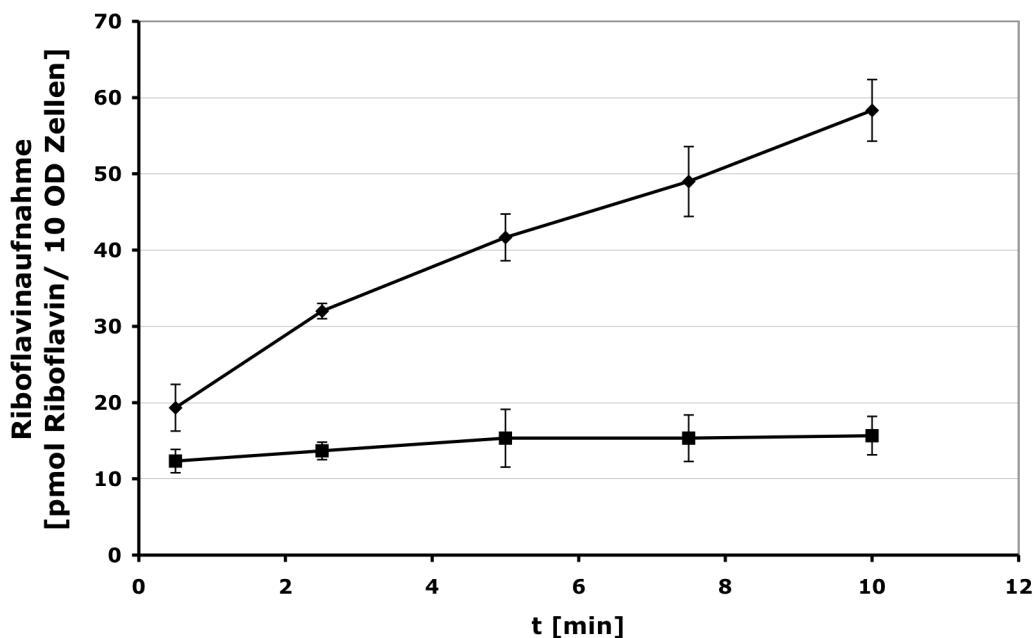


Abb. 3-14: Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae rib4Δ*-Zellen. Die *rib4Δ*-Zellen wurden mit den Plasmiden p426-TDH (■) und p426-TDH-MCH5 (◆) transformiert. Die Vorkultur für den Aufnahmetest wurde in 10 mg/ l Riboflavin auf eine OD₆₀₀ von 1 angezogen, mit riboflavinfreiem Medium gewaschen und üN in riboflavinfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden in einer Endkonzentration von 4 OD/ ml in den Aufnahmetest eingesetzt. Bei allen Messungen handelte es sich um Dreifachbestimmungen. Die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

Mit diesen Aufnahmetests konnte das erste Mal durch Riboflavinaufnahme die Transportfunktion von Mch5p bestätigt werden. Die Riboflavinaufnahme konnte in *S. cerevisiae* jedoch ausschließlich im *rib4Δ*-Stammhintergrund gezeigt werden.

3.1.4.2 Riboflavintransport in *rib4Δ**-Mutanten

Um auszuschließen, dass der Transport durch eine spontan auftretende *rib4Δ**-Mutation bedingt wurde (und nicht durch die Überexpression von *MCH5*), wurden *rib4Δ**-Mutanten (wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben) isoliert und mit den gleichen Plasmiden wie die *rib4Δ*-Zellen transformiert. Diese Zellen wurden ebenfalls zunächst über Nacht in riboflavinfreiem Medium verarmt und danach im Aufnahmetest auf Riboflavintransport untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 3-15 dargestellt.

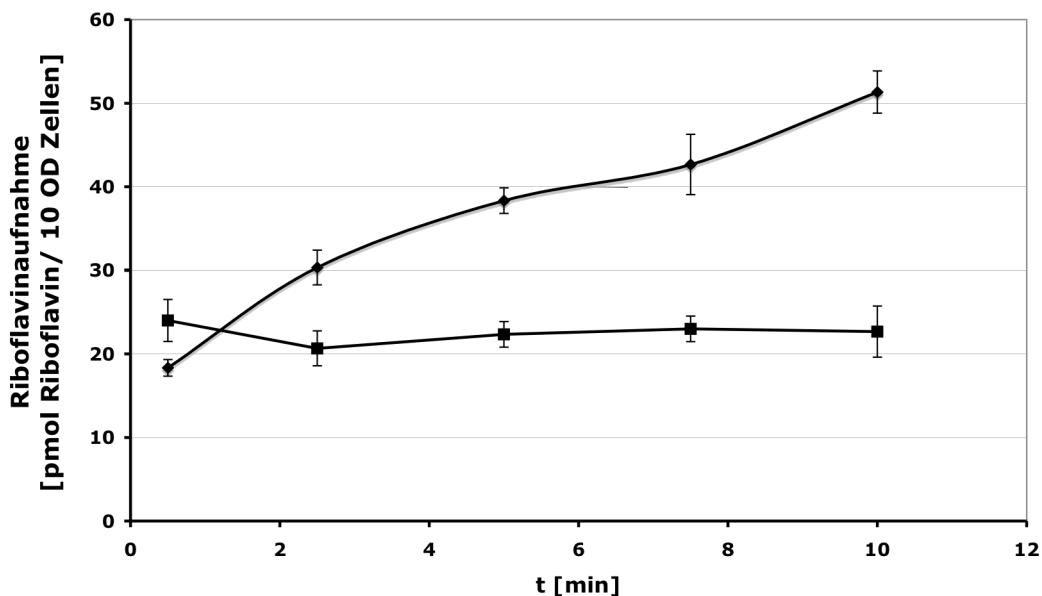


Abb. 3-15: Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae rib4Δ*-Zellen*. Die *rib4Δ**-Zellen wurden mit den Plasmiden p426-TDH (■) und p426-TDH-MCH5 (◆) transformiert. Die Vorkultur für den Aufnahmetest wurde in 10 mg/l Riboflavin auf eine OD₆₀₀ von 1 angezogen, mit riboflavinfreiem Medium gewaschen und üN in riboflavinfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden in einer Endkonzentration von 4 OD/ml in den Aufnahmetest eingesetzt. Bei allen Messungen handelte es sich um Dreifachbestimmungen. Die Standardabweichungen sind im Diagramm als Fehlerbalken dargestellt.

Wie bei *rib4Δ*- ist es auch bei *rib4Δ**-Mutanten notwendig, dass *MCH5* stark überexprimiert wird, um eine Riboflavinaufnahme messen zu können. Mit leerem Plasmid ist auch in *rib4Δ**-Mutanten kein Riboflavintransport messbar. Zwar war in *rib4Δ**-Zellen mit leerem Vektor eine etwas höhere Menge an Riboflavin nachzuweisen als in *rib4Δ*-Zellen, jedoch erfolgte über den Zeitraum von 10 min auch hier keine Akkumulation. Es ist somit auszuschließen, dass der Riboflavintransport in *S. cerevisiae*-Zellen durch eine Mutation, die ein besseres Wachstum auf niedrigeren Riboflavinkonzentrationen erlaubt, verursacht wird. Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass Mch5p der Plasmamembrantransporter für Riboflavin ist.

3.1.4.3 Heterologe Expression von *MCH5* in *S. pombe*

Da in *rib4Δ*-Mutanten stets Komplikationen mit Suppressormutationen auftraten wurde versucht, die Riboflavinaufnahme auch durch heterologe Expression von Mch5p in *S. pombe* zu zeigen. Damit sollte ein organismusunabhängiger Beweis erbracht werden, dass Mch5p das Transportprotein für Riboflavin ist. In *S. pombe*-Wildtypzellen ist wie in *S. cerevisiae*-Wildtypzellen keine Aufnahme von Riboflavin messbar. Da der Versuch in *S. pombe* eine Biosynthesemutante herzustellen erfolglos blieb wurde mit *S. pombe* WT-Zellen gearbeitet. Im *S. pombe*-Genom sind keine Gene mit Homologien zu *MCH5* kodiert.

Zur heterologen Expression wurde *MCH5* in das Plasmid pREP3x, in dem es unter der Kontrolle des *nmt1⁺*-Promotors steht, kloniert und in *S. pombe* transformiert. Der *nmt1⁺*-Promotor wird durch Thiamin im Medium reprimiert und ist in Abwesenheit von Thiamin stark aktiv. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 3-16 gezeigt.

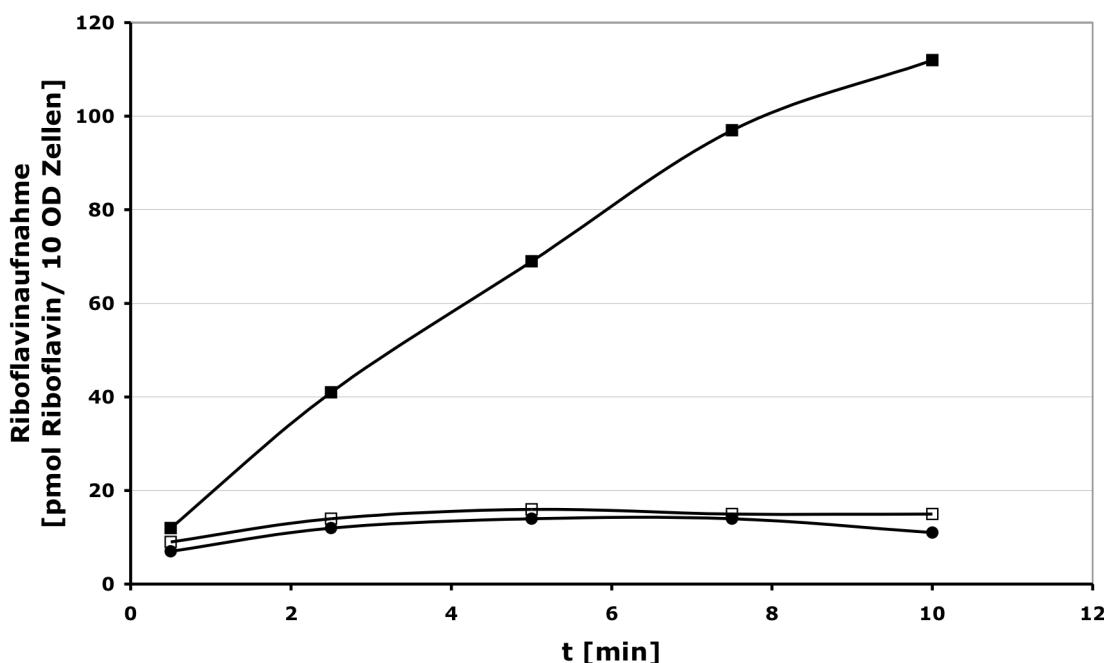


Abb. 3-16: Riboflavaufnahme in *S. pombe* Zellen. Die *S. pombe*-Zellen wurden mit den Plasmiden pREP3x und pREP3-MCH5 transformiert. Die Zellen für den Aufnahmetest wurden in EMM ohne Thiamin (pREP3x (□)) und pREP-MCH5 (■)) bzw. in EMM mit 5 mg/ l Thiamin (pREP-MCH5 (●)) auf eine OD₆₀₀ von 1 angezogen und in einer Endkonzentration von 4 OD/ ml in den Aufnahmetest eingesetzt.

In den *S. pombe*-Zellen konnte trotz intakter Riboflavinbiosynthese bei Überexpression von *MCH5* eine Aufnahme von Riboflavin gemessen werden. Die Expression von *MCH5* ist dafür unbedingt erforderlich, denn nur die in thiaminfreiem Medium angezogenen Zellen zeigten Aufnahme von Riboflavin. Der Transport in die *S. pombe*-Zellen erscheint sogar effizienter als der in *S. cerevisiae*, da eine deutlich größere Menge des radioaktiv markierten [¹⁴C]-Riboflavins akkumuliert wurde als in *S. cerevisiae*-Zellen.

Die Wachstumstests und die Tatsache, dass eine Überexpression von *MCH5* sowohl in Bäckerhefe als auch heterolog in Spalthefe zu einer messbaren Riboflavinaufnahme führte, unterstützen ebenfalls die genannte Vermutung der Rolle von Mch5p. Wenn es sich bei Mch5p um einen Aktivator des Riboflavintransporters handeln würde, müsste das nicht bekannte Riboflavintransportprotein in *S. pombe* über den gleichen Mechanismus aktivierbar sein, wie das in *S. cerevisiae*. Da dies sehr unwahrscheinlich ist, wird davon ausgegangen, dass es sich bei Mch5p um das Riboflavintransportprotein handelt.

3.1.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten von Mch5p

MCH5-exprimierende *S. pombe*-Zellen zeigten eine höhere Riboflavinaufnahme als *S. cerevisiae-rib4Δ*-Zellen mit dem *MCH5*-Überexpressionsplasmid. Die *S. pombe*-Zellen sind genetisch deutlich stabiler und es ist einfacher eine Aufnahme von Riboflavin zu messen. Da die Proteinkinetiken unabhängig vom Organismus sind, wurden die kinetischen Konstanten für Mch5p in den *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen gemessen. Da sich die Aufnahmegeschwindigkeiten für Riboflavin jedoch stark von Tag zu Tag unterschieden, wurden alle zusammengehörigen Messungen immer mit Zellen aus derselben Kultur durchgeführt.

3.1.5.1 Bestimmung des pH-Optimums

Zunächst wurde durch Aufnahmetests das pH-Optimum für Mch5p ermittelt. Dazu wurden diese bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3-17 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass das pH-Optimum für Mch5p für die Riboflavinaufnahme in Bäckerhefe, wie auch von Perl *et al.* (1976) beschrieben, bei 7,5 liegt. Bei pH-Werten von 7 und 8 war die Aufnahmegeschwindigkeit auf ungefähr 70 % reduziert.

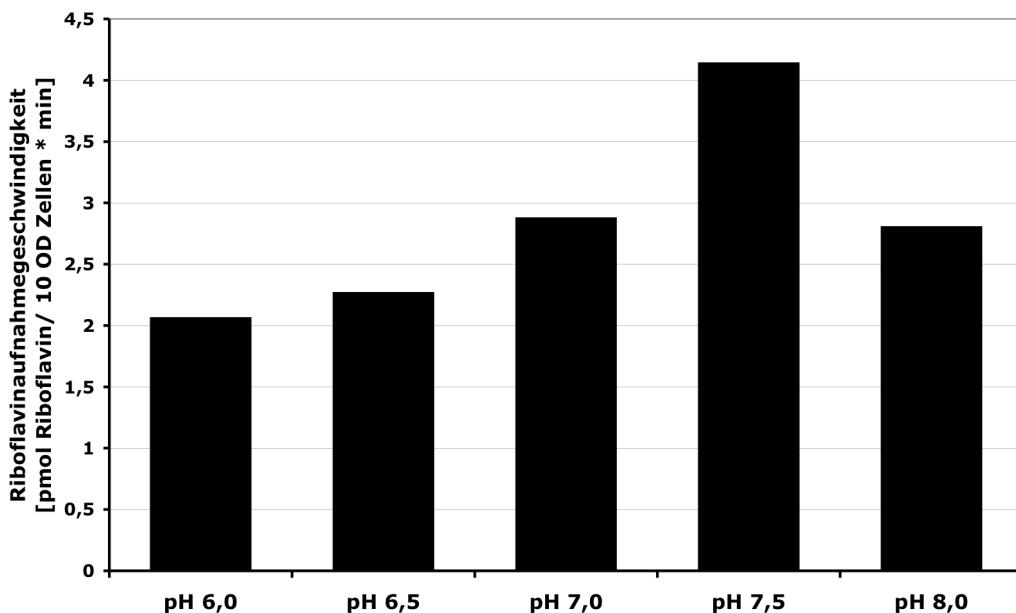


Abb. 3-17: pH-Optimum von Mch5p. Die *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen wurden (wie unter 2.2.4.2.1 beschrieben) in Wasser resuspendiert, zum Aufnahmetestpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer (unterschiedliche pH-Werte), 12 mM KCl) gegeben und die Aufnahmegeschwindigkeit bestimmt. Im Diagramm ist die Aufnahmegeschwindigkeit bei den jeweiligen pH-Werten aufgetragen.

3.1.5.2 Bestimmung des K_m -Werts

Proteinabhängige Transportvorgänge weisen ebenso wie Enzymaktivitäten eine Michaelis-Menten-Kinetik auf. Da die Riboflavinaufnahme eine Sättigungskinetik zeigt, wurde im Folgenden der K_m -Wert bestimmt. Hierzu wurde die Aufnahmegeschwindigkeit bei unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen bestimmt und in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Die Bestimmung wurde dreimal durchgeführt. In Abbildung 3-18 ist die Auftragung, die dem Mittelwert am nächsten kommt dargestellt.

In den drei unabhängigen K_m -Wertbestimmungen konnten K_m -Werte von 10, 17 und 25 μM ermittelt werden. Es konnte somit der Mittelwert von 17 μM mit einer Standardabweichung von 6 μM berechnet werden. Dieser Wert stimmt gut mit dem von Perl *et al.* (1976) bestimmten Wert von 15 μM in *S. cerevisiae* überein. Sowohl das pH-Optimum als auch der für Mch5p ermittelte K_m -Wert sind damit gut mit den Werten von Perl *et al.* (1976) vergleichbar.

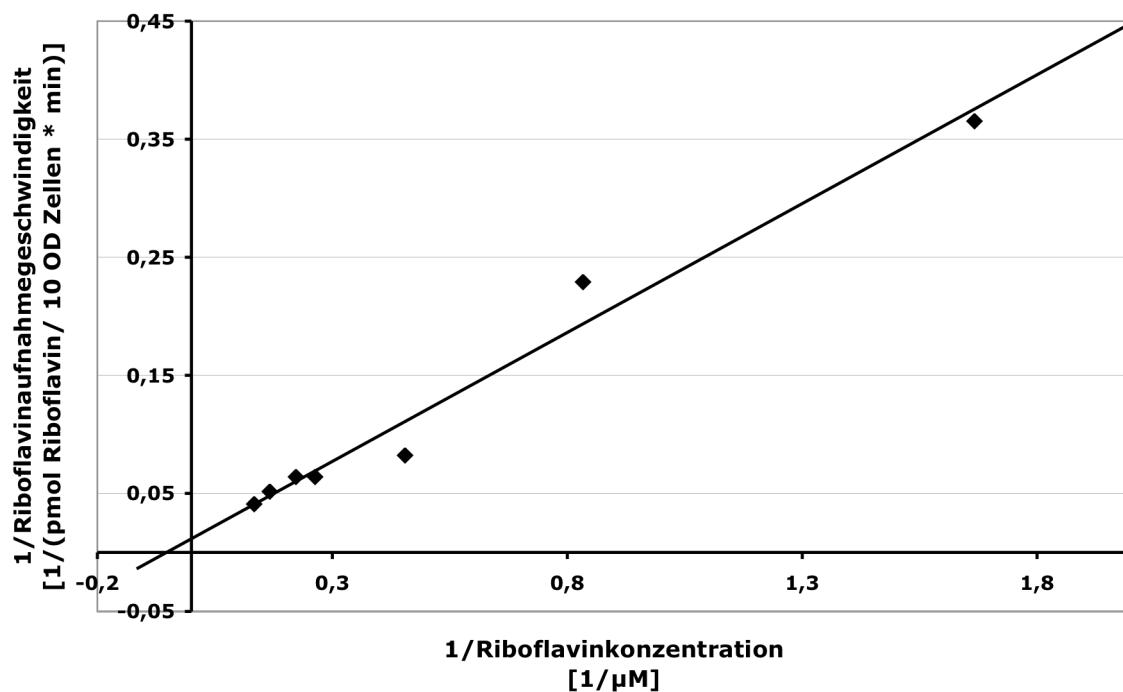


Abb. 3-18: K_m -Wert von Mch5p. Die *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen wurden im Standardaufnahmetest mit variierenden Riboflavinkonzentrationen (0,6; 1,2; 2,2; 3,8; 4,5; 6,0 und 7,1 μM) eingesetzt. Die daraus resultierenden Aufnahmegeschwindigkeiten wurden in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Aus dieser Auftragung ergibt sich ein K_m -Wert von 17 μM .

3.1.5.3 Energetisierung der Riboflavinaufnahme

Beim Riboflavintransport in menschlichen Zellen und bei *B. subtilis* wurde von Cecchini *et al.* (1979) und Gastaldi *et al.* (2000) beschrieben, dass das Riboflavin direkt nach der Aufnahme phosphoryliert wird. Es wurde in *S. cerevisiae* durch eine Auftrennung von Riboflavin, FMN und FAD mittels Dünnschichtchromatographie (und durch den Nachweis der Radioaktivität am Phosphoimager) gezeigt, dass in einem Zeitintervall von einer Stunde das von *S. cerevisiae* aufgenommene [¹⁴C]-markierte Riboflavin nicht zu FMN bzw. FAD umgesetzt wurde. Es ist somit auszuschließen, dass sich an den Import von Riboflavin die Phosphorylierung direkt anschließt (siehe Abbildung 3-19).

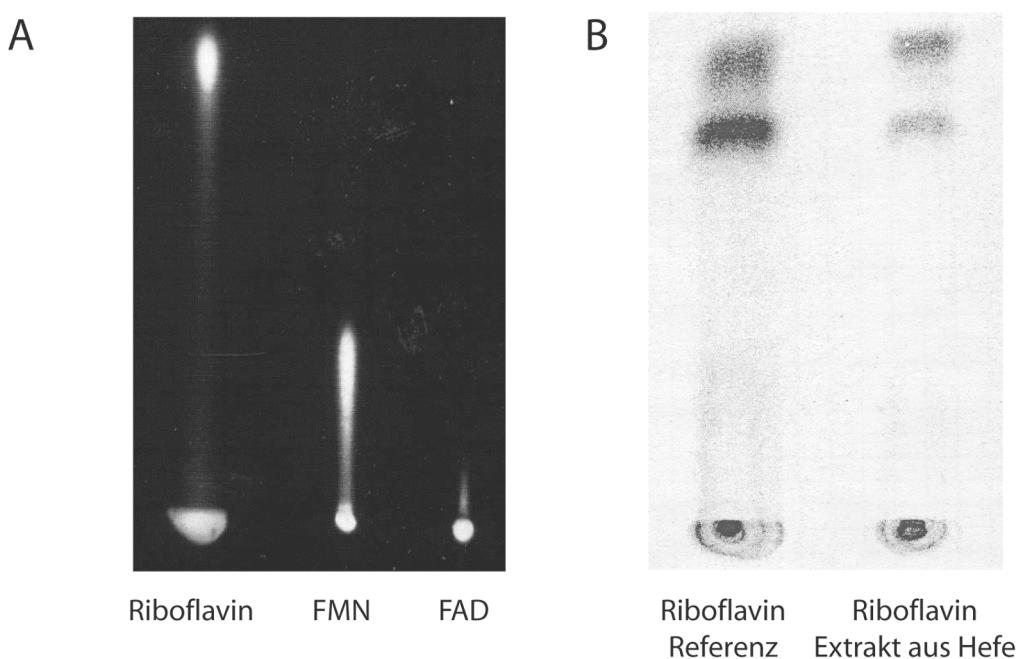


Abb. 3-19: Untersuchung der Verstoffwechselung von Riboflavin. In A ist das Laufverhalten von Riboflavin, FMN und FAD dargestellt. Die Detektion erfolgte über Fluoreszenz im UV-Licht. B zeigt die Lokalisation von radioaktiv markiertem Riboflavin. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Phosphoimagerscreens. Das von der Zelle aufgenommene Riboflavin wies 1 Stunde nach der Aufnahme das gleiche Laufverhalten wie das als Referenz aufgetragene markierte Riboflavin auf.

Um zu untersuchen, ob es sich beim Riboflavintransport durch Mch5p um einen aktiven oder passiven Transportvorgang handelt, wurde der Einfluss der Transportenergetisierung und die Hemmung durch Protonophoren untersucht. In Tabelle 3-1 ist dargestellt, wie sich die Transportgeschwindigkeit durch eine Energetisierung mit Glucose oder Ethanol veränderte (Der Einfluß von Methanol wurde überprüft, da es in weiteren Experimenten als Lösungsmittel verwendet wurde).

Energiequelle	Konzentration	Aufnahmgeschwindigkeit	Aktivität
	%	pmol/ 10 OD * min	%
keine Zugabe		11,04 ± 0,85	100
Glucose	2	11,57 ± 1,74	105
Ethanol	2	10,30 ± 2,59	93
Methanol	2	10,87 ± 1,18	98

Tab. 3-1: Einfluss der Energetisierung auf die Aktivität von Mch5p. Die *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen wurden im Standardaufnahmetest unter Zugabe von Glucose, Ethanol oder Methanol (in den angegebenen Konzentrationen) eingesetzt. Die in Aufnahmetestpuffer suspendierten Zellen wurden je 1 min mit den energetisierenden Substanzen bei 30 °C vorinkubiert und der Aufnahmetest durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Riboflavin gestartet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Riboflavinaufnahme (wie bereits von Perl *et al.* (1976) beschrieben) auch in *MCH5* exprimierenden *S. pombe*-Zellen durch Energetisierung nicht stimuliert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Mch5p um einen Uniporter handelt, der die Riboflavinaufnahme durch erleichterte Diffusion katalysiert. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde untersucht, ob die Riboflavinaufnahme durch Zugabe von Protonophoren inhibierbar ist (siehe Tabelle 3-2).

Protonophor	Konzentration	Aufnahmgeschwindigkeit	Aktivität
	µM	pmol/ 10 OD * min	%
keine Zugabe		7,53 ± 1,91	100
CCCP	0,1	6,40 ± 1,01	85
FCCP	0,1	4,87 ± 0,66	65
DNP	5	5,70 ± 0,96	76

Tab. 3-2: Einfluss von Protonophoren auf die Aktivität von Mch5p. Die *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen wurden im Standardaufnahmetest unter Zugabe von Carbonylcyanid *m*-Chlorophenylhydrazon (CCCP), Carbonylcyanid *p*-(Trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) oder 2,4-Dinitrophenol (DNP) (in den angegebenen Konzentrationen) eingesetzt. Die in Aufnahmetestpuffer suspendierten Zellen wurden je 1 min mit dem Protonophor bei 30 °C vorinkubiert und der Aufnahmetest durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Riboflavin gestartet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Aufnahmgeschwindigkeit wurde durch Zugabe von FCCP auf 65 % reduziert. Um zu überprüfen ob diese Reduktion signifikant ist, wurde der Effekt von FCCP sowohl bei einem bekannten Protonensymporter als auch bei einem bekannten Uniporter untersucht. Als Beispiel für einen Protonensymport wurde der Effekt auf die Biotinaufnahme durch Vht1p analysiert (Stolz *et al.* 1999) und für einen Uniport der Effekt auf die Glucoseaufnahme durch Hxt-Proteine (Kruckeberg 1996). Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Substrat	Protonophor	Konzentration	Aufnahmegeschwindigkeit	Aktivität
		<i>mM</i>	<i>pmol/ 10 OD * min</i>	%
Biotin	keine Zugabe		$105,8 \pm 13,7$	100
	FCCP	0,1	$26,5 \pm 3,8$	25
		<i>mM</i>	<i>μmol/ 10 OD * min</i>	%
Glucose	keine Zugabe		$119,3 \pm 11,9$	100
	FCCP	0,1	$82,3 \pm 9,3$	69

Tab. 3-3: Einfluss von FCCP auf die Transportaktivität eines Protonensymporters und eines Uniporters.
Die Aufnahmetests für Biotin und Glucose wurden wie unter 2.2.4.2 beschrieben in *S. cerevisiae* BY4741-Wildtypzellen mit radioaktiv markierten Substraten durchgeführt. Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde ohne Protonophoren und nach Zugabe von FCCP (in der oben angegebenen Konzentration) bestimmt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Durch Zugabe von FCCP wurde die Geschwindigkeit der Biotinaufnahme auf 25 % und die der Glucoseaufnahme auf 69 % reduziert. Es ist bekannt, dass es sich bei der Glucoseaufnahme in *S. cerevisiae* um einen Uniport handelt (Kruckeberg 1996) und dennoch konnte eine um 31 % verringerte Aufnahmegeschwindigkeit gemessen werden. Aus den Ergebnissen kann gefolgt werden, dass die Reduktion der Aufnahmegeschwindigkeit beim Riboflavintransport ebenfalls nicht signifikant ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Riboflavaufnahme durch Energetisierung nicht stimuliert werden kann. Durch die Zugabe von Protonophoren wird sie zwar gehemmt, aber nicht stärker als die Aufnahme, die durch andere Uniporter katalysiert wird. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgt werden, dass Mch5p keinen aktiven Transport katalysiert sondern die passive Diffusion erleichtert.

3.1.5.4 Untersuchung von Kompetitoren der Riboflavaufnahme

Um die Substratspezifität von Mch5p zu untersuchen, wurde eine Beeinflussung der Aufnahmegeschwindigkeit von Riboflavin durch verschiedene Analoga untersucht. Die daraus resultierenden Daten sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass ein zweifacher Überschuss an unmarkiertem Riboflavin zu einer Reduktion der Riboflavaufnahme auf 52 % führt. Die ermittelte Aufnahmerate war niedriger als durch die Berechnung nach der Michaelis-Menten-Gleichung erwartet werden konnte.

Kompetitor	Konzentration μM	Lösungsmittel (Endkonzentration im Testansatz)	Aufnahmegeschwindigkeit pmol/ 10 OD * min	Aktivität %
	%			
ohne Kompetitor			17,74 ± 2,47	100
Riboflavin	6,4	Wasser (100)	9,25 ± 0,99	52
FMN	20	Wasser (100)	15,44 ± 0,42	87
FAD	20	Wasser (100)	14,27 ± 1,91	80
Lumichrom	20	Ethanol (2)	8,22 ± 1,20	46
Acriflavin	20	Methanol (2)	2,86 ± 0,46	16

Tab. 3-4: Kompetitoren der Riboflavinaufnahme. Mch5p exprimierende *S. pombe*-Zellen wurden im Standardaufnahmetest eingesetzt. Das radioaktiv markierte Riboflavin wurde jeweils in der Konzentration von 3,2 μM eingesetzt. Die Bestimmung der Kompetition um die Riboflavinaufnahme wurde über eine Verringerung der Aufnahme des markierten [¹⁴C]-Riboflavins durch die Zugabe der unmarkierten Substrate bestimmt. Unmarkiertes Riboflavin, FMN, FAD, Lumichrom und Acriflavin wurden in den angegebenen Konzentrationen zu dem Testansatz gegeben. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Durch Erhöhung der Riboflavinkonzentration von 3,2 auf 9,6 μM stieg die Aufnahmegeschwindigkeit um den Faktor 2,3 an. Die im Test eingesetzten Konzentrationen liegen noch unterhalb des K_m -Werts. Da jedoch nur ein Drittel der Riboflavinmoleküle radioaktiv markiert war, sollte die messbare Aufnahmerate 76 % der ursprünglichen betragen. Bei einem K_m -Wert von 17 μM zeigte sich eine Reduktion auf 52 %. Da jedoch bei der Bestimmung des K_m -Werts eine Standardabweichung von ± 6 μM errechnet wurde, liegt diese Abweichung im Rahmen der Standardabweichung.

Die phosphorylierten Riboflavinderivate FMN und FAD zeigten keine signifikante Reduktion der Aufnahmerate und werden vermutlich nicht über Mch5p transportiert. Eine Aufnahme von FMN und FAD ist für viele Organismen auch nicht notwendig, da sie größtenteils in der Lage sind diese Stoffe aus Riboflavin selbst zu synthetisieren. Die Zugabe der Riboflavinabbauprodukte Lumichrom und Acriflavin, welche kein Ribitol tragen, (Bender 2003) führte zu einer starken Verringerung der Riboflavinaufnahme durch Mch5p. Eine Beeinflussung der Aufnahmegeschwindigkeit durch die verwendeten Lösungsmittel Methanol und Ethanol kann ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 3-1).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass unmarkiertes Riboflavin mit dem markierten um die Aufnahme durch Mch5p konkurriert. Im Gegensatz zu Lumichrom und Acriflavin zeigen FMN und FAD keine signifikante Verringerung der Aufnahmerate.

3.2 Expressionsanalyse von *rib5Δ*-Mutanten

Eine Mutation in einem Gen der Riboflavinbiosynthese scheint (wie bereits in Kapitel 3.1.2 gezeigt) zu einer verringerten intrazellulären Riboflavin- bzw. FMN- und FAD-Konzentration zu führen. Es sollte deshalb in einem genomweiten DNA-Microarray untersucht werden, welchen Einfluss dies auf die Expression von Genen hat. Mit dieser Untersuchung wurde nach Proteinen gesucht, die am intrazellulären Flavintransport beteiligt sein könnten. Für diesen Versuch wurden *S. cerevisiae* Wildtyp- und *rib5Δ*-Zellen in YPD mit einer Riboflavinzugabe von 10 mg/ l angezogen. Bei dieser Riboflavinkonzentration wächst die *rib5Δ*-Mutante mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Wildtyp (siehe Abbildung 3-20).

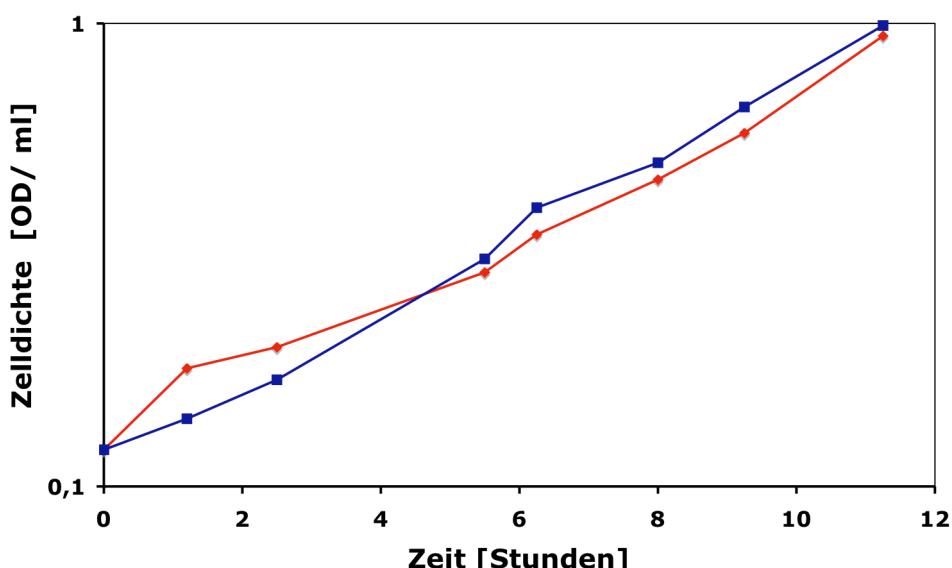


Abb. 3-20: Wachstumskurven der WT- (blau) und *rib5Δ*-Zellen (rot). Die Zellen für die Isolierung der mRNA für den DNA-Array wurden in SD-Medium mit 10 mg/ l Riboflavin angezogen. Die optische Dichte der Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Bei der OD₆₀₀ von 1 wurden die Zellen geerntet und daraus die RNA isoliert.

Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 1 geerntet und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde im Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg für die Hybridisierung mit einem Gen-Chip prozessiert. Die daraus resultierende markierte und fragmentierte cRNA wurde mit dem Affymetrix GeneChip® Yeast Genome S98 Array untersucht. Dieser Chip enthält Oligonucleotide für ungefähr 6400 *S. cerevisiae* Gene (aus dem Stammhintergrund S288C) und weitere Oligonucleotide für etwa 600 putative offene Leserahmen. Die Auswertung des Microarrays erfolgte, indem das Hybridisierungssignal des jeweiligen Gens vom WT und der *rib5Δ*-Mutante verglichen wurde.

Bei dieser Untersuchung waren 49,6 % der untersuchten Gene reguliert. Davon zeigten 33 % der Gene in der *rib5Δ*-Mutante eine erhöhte Expression und 16,9 % eine verringerte. Dies machte es schwierig aus diesem Experiment brauchbare Ergebnisse zu erhalten. Die Streung dieser Ergebnisse ist jedoch unbekannt, da es sich nur um eine Einfachbestimmung handelte.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression der Biosynthesegene durch das in der Zelle vorhandene Riboflavin reguliert zu sein scheint. Von *RIB5* konnte in der *rib5Δ*-Mutante (wie erwartet) keine mRNA detektiert werden. Die Expression von weiteren Riboflavinbiosynthesegenen war jedoch erhöht. Von *RIB1* (3 x), *RIB2* (1,6 x), *RIB3* (2,8 x) und *RIB7* (2,5 x) konnten deutlich höhere mRNA-Menge detektiert werden. Lediglich *RIB4* zeigte keine erhöhte Expression.

Neben den Genen der Riboflavinbiosynthese war auch eine Vielzahl von Genen für Transportproteine und putative Transportproteine in der *rib5Δ*-Mutante hochreguliert. Eine Auswahl dieser Gene ist in Tabelle 3-5 dargestellt.

Ebenfalls in Tabelle 3-5 ist zu sehen, dass vier Gene der *MCH*-Familie in der *rib5Δ*-Mutante hochreguliert waren. Von *MCH2* konnte weder im Wildtyp noch in der Biosynthesemutante mRNA detektiert werden, es war folglich nicht exprimiert. Von *MCH5* war eine Expressionserhöhung um den Faktor 3,2 zu sehen. Obwohl auch andere *MCH*-Gene erhöhte Expression in der Biosynthesemutante zeigten deuten die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1.4 darauf hin, dass diese Gene keine Bedeutung im Riboflavinstoffwechsel haben.

Neben einigen Genen der *Mchp*-Familie waren auch einige der *Dal5p*-Familie hochreguliert. Aus der *Dal5p*-Familie sind die Funktionen von *Vht1p* und *Dal5p* bekannt, was eine Beteiligung dieser Proteine am Flavintransport unwahrscheinlich erscheinen lässt (Stolz und Sauer 1999; Turoscy und Cooper 1987). Bei den Loci *YLL055w* und *YIL166c* handelt es sich um hypothetische ORFs, sie wurden deshalb nicht weiter untersucht. Lediglich bei *Seo1p* (Suppressor of ethionine sulfoxide resistance 1) handelt es sich um ein bestätigtes Protein, dessen Funktion allerdings noch unbekannt ist. Jedoch liegt *SEO1* auf dem Stück eines Chromosoms, das in einigen *S. cerevisiae* Stämmen komplett fehlt (Daran-Lapujade *et al.* 2003). Dies macht es unwahrscheinlich, dass dieses Protein eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Zelle spielt. Im Stamm CEN.PK 13D fehlt *SEO1* gänzlich (Daran-Lapujade *et al.* 2003). Durch den Vergleich der Abbildung 3-5 mit Abbildung 3-8 ist zu sehen, dass ein Fehlen dieses Gens zu keiner Verstärkung des Wachstumsphänotyps in *rib5Δ*-Mutanten führte. Somit ist es auch unwahrscheinlich, dass *Seo1p* eine wichtige Rolle im Flavintransport spielt.

Name	ORF	Regulation	Function	Familie
MCH4	YOL119C	A-P	Monocarboxylatpermease Homologes	MCH
SEO1	YAL067C	A-P	Permease (putativ)	DAL5
VHT1	YGR065C	6,1	H+-Biotinsympporter	DAL5
	YLL055W	4,9	Hypothetischer ORF	DAL5
SAM3	YPL274W	4,6	hoch affine S-Adenosylmethionin Permease	Aminosäurepermease
MCH3	YNL125C	4,6	Monocarboxylatpermease Homologes	MCH
MCH1	YDL054C	4,3	Monocarboxylatpermease Homologes	MCH
	YIL121W	4,0	Plasmamembrantransporter	DHA12
MMP1	YLL061W	4,0	hoch affine S-Methylmethionin Permease	Aminosäurepermease
YMC1	YPR058W	3,7	Carrierprotein (putativ)	Mitochondrielles Carrierprotein
YMC2	YBR104W	3,7	Mitochondrielles Carrierprotein	Mitochondrielles Carrierprotein
PDR12	YPL058C	3,7	Multidrugresistant Transporter	ABC transporter
ATR1	YML116W	3,7	Multidrugresistant Transporter	DHA14
	YHR048W	3,5	Hypothetischer ORF	Zuckertransporter
HVG1	YER039C	3,5	Nucleotidzuckertransporter (putativ)	NST
ENB1	YOL158C	3,5	Enterobactintransporter	MFS-MDR
	YCR023C	3,2	Hypothetischer ORF	DHA12
MCH5	YOR306C	3,2	Riboflavin-Plasmamembrantransporter	MCH
SSU1	YPL092W	3,2	major facilitator superfamily	TDT
AQR2	YBR043C	3,0	Multidrugresistant Transporter	DHA12
	YLR152C	3,0	Hypothetischer ORF	Auxin Efflux Carrier
	YIL166C	2,8	Hypothetischer ORF	DAL5
SNQ2	YDR011W	2,8	ABC Transporter	ABC Transporter
ARN2	YHL047C	2,6	Triacetyl fusarinine C transporter	Zuckertransporter
	YBR241C	2,5	Hypothetical ORF	Zuckertransporter
AUS1	YOR011W	2,5	Protein involved in sterol uptake and anaerobic growth	ABC transporter
	YLR454W	2,5	Hypothetischer ORF	
PDR11	YIL013C	2,3	ABC Transporter (putativ)	ABC Transporter
	YGR125W	2,3	Hypothetischer ORF	Sulfattransporter
	YGR281W	2,1	Oligomycin Resistenz	ABC transporter
	YDL199C	2,1	Hypothetischer ORF	Zuckertransporter
PXA1	YPL147W	2,0	notwendig für beta-Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren	ABC transporter
DAL5	YJR152W	2,0	allantoate permease	DAL5
MCH2	YKL221W	NC	Monocarboxylatpermease Homologes	MCH

Tab. 3-5: Expressionsänderung von Membranproteinen in der *rib5Δ*-Mutante. Die Funktion und Familienzugehörigkeit der Gene entspricht den Angaben der *Saccharomyces* Genome Database (SGD). A-P (Absent-Present) gibt an, dass für dieses Gen im WT keine mRNA detektiert werden konnte, während es in der *rib5Δ*-Mutante exprimiert war. Die Zahlenwerte zeigen, um welchen Faktor die mRNA-Menge in der *rib5Δ*-Mutante erhöht ist. NC (not changed) gibt an, dass die Expression dieses Gens nicht verändert war.

Neben diesen Transmembranproteinen waren noch einige Gene aus anderen Familien stark reguliert. Auffällig waren dabei die Gene *YMC1* und *YMC2* (*yeast mitochondrial carrier 1* und *2*), die von el Moualij *et al.* (1997) als mitochondrielle Transportproteine beschrieben wurden. Sie gehören zur Familie der mitochondriellen Carrier (MCF) (Palmieri 1994). Manche Mitglieder dieser MCF-Familie sind aber nicht in der mitochondriellen Membran lokalisiert sondern in der von Peroxisomen. Ein Beispiel dafür ist das den Transport von Adeninnucleotiden in die Peroxisomen katalysierende Protein Ant1p (Palmieri *et al.* 2001). Dies führte zu der Überlegung, dass eines der Ymc-Proteine nicht in Mitochondrien-membranen, sondern in Membranen der Peroxisomen lokalisiert sein könnte. FAD wird sowohl für die Aktivität der Succinatdehydrogenase (siehe Kapitel 1.1.3) in den Mitochondrien als auch für die β -Oxidation von Fettsäuren in den Peroxisomen (van Roermund *et al.* 2003) benötigt.

Dies führte zu der Vermutung, dass diese beiden um den Faktor 3,1 hochregulierten Gene eine Rolle im Flavintransport in den Mitochondrien oder Peroxisomen spielen könnten. Bei der Untersuchung von *ymcΔ rib5Δ*-Mutanten wurden jedoch weder mit Glycerin/Ethanol noch mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle Wachstumsdefizite gesehen. Es ist somit nicht gelungen, eine Beteiligung von Ymc1p und Ymc2p am intrazellulären Flavintransport nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Neben der erhöhten Expression von einigen Membranprotein-kodierenden Genen konnte auch für einige Gene von flavinabhängigen Enzymen eine Erhöhung der Expression gesehen werden. Die FMN-abhängige Pyridoxin- bzw. Pyridoxamin-Phosphatoxidase Pdx3p (*Pyridoxine auxotrophy 1*), zeigte eine Expressionserhöhung um den Faktor 3,2. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung vom Pyridoxamin- bzw. Pyridoxin-5'-Phosphat zur Coenzym-form Pyridoxal-5'-Phosphat (Loubbardi *et al.* 1995). Auch bei der FAD-abhängigen Prolinoxidase Put1p (*Proline utilisation 1*) ist in den Biosynthesemutanten eine um den Faktor 3 erhöhte Expression zu sehen. Put1p wird zur Degradation von Prolin als sekundäre Stickstoffquelle benötigt. Es katalysiert den ersten Schritt der Umsetzung von Prolin zu Glutamat (Wang und Brandriss 1986). Ein weiteres FAD-abhängiges, um den Faktor 2,6 hochreguliertes, Enzym ist die Sulfhydryloxidase Erv1p (*ER vesicle 1*). Das Enzym ist in der inneren mitochondriellen Membran lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Reifung von cytosolischen Eisen-Schwefel-Proteinen (Lange *et al.* 2001).

Zusammenfassend konnte im DNA-Microarray gezeigt werden, dass die meisten Gene der Riboflavinbiosynthese in einer Biosynthesemutante eine erhöhte Expression aufwiesen. Neben den Biosynthesegenen konnte auch bei einigen flavinabhängigen Enzymen in der

Biosynthesemutante mehr mRNA als im Wildtyp gefunden werden. Mit Hilfe des DNA-Microarrays konnte kein weiteres Flavintransportprotein identifiziert werden, jedoch war die Expression des Riboflavintransporters *MCH5* in der *rib5Δ*-Mutante erhöht. Da es sich bei dem DNA-Microarray um eine Einfachbestimmung handelte, müssten die daraus erhaltenen Befunde aber durch weitere Hybridisierungen bestätigt werden.

3.3 Riboflavinabhängige Regulation der *MCH5*-Expression

Der DNA-Microarray zeigte, dass die Expression von *MCH5* und der *RIB*-Gene in Riboflavinbiosynthesemutanten erhöht war. Möglicherweise ist die Zelle in der Lage, eine zu niedrige Riboflavinkonzentration wahrzunehmen und in Folge dessen die Gene, die an der Beschaffung von Riboflavin beteiligt sind, hochzuregulieren. Um eine genetische Regulation der Expression von *MCH5* zu untersuchen, wurden 828 bp des *MCH5*-Promotors, in dem Vektor YCplac33 (CEN, *URA3*), vor das *lacZ*-Gen (*MCH5*prom-*lacZ*) kloniert. Dieses Plasmid wurde als Reporterkonstrukt für die Promotoraktivität von *MCH5* eingesetzt. Das *MCH5*prom-*lacZ*-Konstrukt wurde in einen WT- und einen *rib5Δ*-Stamm transformiert. Zunächst wurde überprüft, ob das Ergebnis des DNA-Microarrays bestätigt werden konnte. Die Zellen wurden mit der gleichen Riboflavinkonzentration (10 mg/l) wie für den Array, jedoch in SD-Medium (ohne Uracil, um den Selektionsdruck für das *MCH5*prom-*lacZ*-Reporterplasmid aufrecht zu erhalten) angezogen. In diesem Experiment konnte für den WT eine β-Galactosidaseaktivität von 4,9 MillerU und für die *rib5Δ*-Mutante von 11,2 MillerU ermittelt werden. Dies entspricht einem niedrigeren Faktor von 2,3 im Gegensatz zu dem Faktor von 3,2 aus dem DNA-Microarray. Da es sich bei beiden Experimenten um Einfachbestimmungen handelte, kann dies jedoch auch auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden. Wiederum wurde gezeigt, dass die Expression von *MCH5* in der Biosynthesemutante erhöht war.

3.3.1 Expression von *MCH5* in Abhängigkeit der Riboflavinkonzentration

In früheren Untersuchungen in Bäckerhefe und anderen Pilzen konnte Riboflavinaufnahme nur in riboflavinauxotrophen Mutanten gemessen werden (Förster *et al.* 2001; Perl *et al.* 1976; Sibirnyi *et al.* 1977) und es wurde vermutet, dass intrazelluläre Flavine die Biosynthese des Transporters reprimieren (Perl *et al.* 1976).

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Erhöhung der *MCH5*-Expression nur durch den Verlust von *RIB5* erfolgt oder auch durch verschiedene Riboflavin-Konzentrationen bzw. der Menge von bereits vorhandenem Mch5p. Dazu wurde zunächst neben dem WT und der *rib5Δ*-Mutante das *MCH5*prom-lacZ-Reporterkonstrukt auch in die *rib5Δ mch5Δ*-Mutante transformiert. Die Zellen wurden daraufhin in SD-Medium mit unterschiedlichen Riboflavin-Konzentrationen angezogen und die β -Galactosidaseaktivität (als direktes Maß für die Promoteraktivität von *MCH5*) der jeweiligen Zellen bestimmt (siehe Abbildung 3-21).

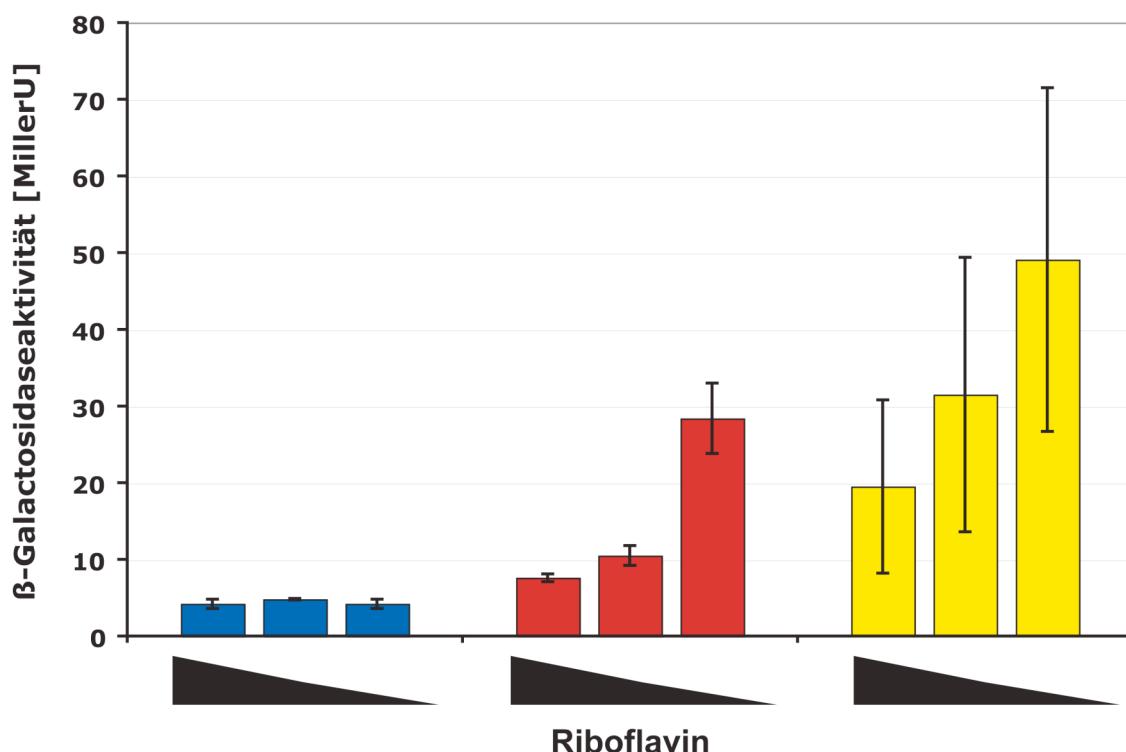


Abb. 3-21: *MCH5*-Promotoraktivität beim WT (blau), der *rib5Δ*-Mutante (rot) und der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante (gelb) in unterschiedlichen Riboflavin-Konzentrationen. Die Zellen mit dem angegebenen Genotyp und dem *MCH5*prom-lacZ-Reporterkonstrukt wurden üN in SD-Medium mit 20 mg/ l Riboflavin vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium und in Medien mit 20, 10 und 0,2 mg/ l Riboflavin (von links nach rechts aufgetragen) überimpft. Die Kulturen wurden für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität erfolgte durch den Aktivitätstest mit *ortho*-Nitrophenyl- β -D-Galactosid als Substrat. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Expression von *MCH5* im WT nicht durch die extrazelluläre Riboflavin-Konzentration veränderte. Im Gegensatz dazu besitzen *rib5Δ*- und *rib5Δ mch5Δ*-Mutanten eine verminderte Expression des Reportergens bei steigender extrazellulärer Riboflavin-Konzentration. Die Expression von *MCH5* zeigte in der *rib5Δ*-Mutante eine deutliche Abhängigkeit vom vorhandenen Riboflavin. Obwohl bei der

rib5Δ mch5Δ-Doppelmutante eine deutlich höhere Standardabweichung als bei der *rib5Δ*-Mutante vorlag, kann die Zelle anscheinend wahrnehmen ob genügend Riboflavin vorhanden ist. Das heißt also, dass die Biosynthesemutanten in der Lage sind wahrzunehmen, wieviel Riboflavin zur Verfügung steht und als Folge eines Mangels den Transporter exprimieren können.

3.3.2 Identifizierung von Transkriptionsfaktorbindestellen im *MCH5*-Promotor

Da eine riboflavinabhängige Expression des *MCH5*-Promotors gezeigt werden konnte, wurde der Promotor auf mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Nach den vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindestellen durch Harbison *et al.* (2004) und Lee *et al.* (2002) wurde der Promotor wie in Abbildung 3-22 dargestellt verkürzt.

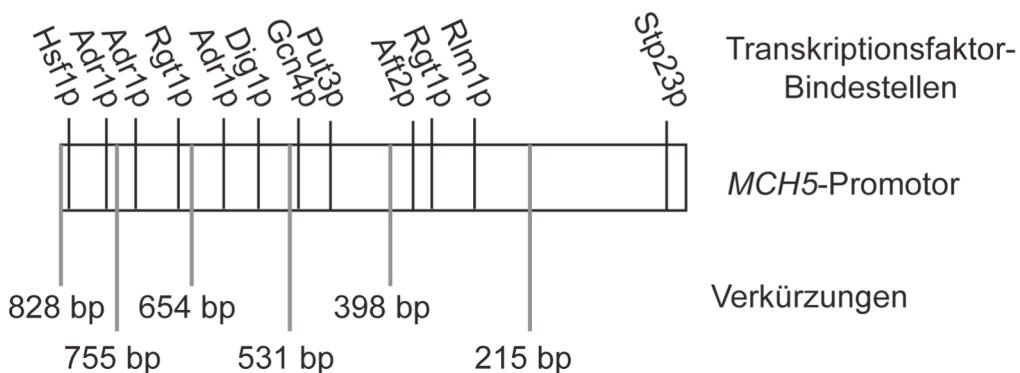


Abb. 3-22: Vorhergesagte Transkriptionsfaktorbindestellen und die entsprechenden Promotorverkürzungen. Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen wurden nach den Daten von Harbison *et al.* und Lee *et al.* interpretiert (Harbison *et al.* 2004; Lee *et al.* 2002). Der Promotor wurde pro Konstrukt um je zwei der vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindestellen verkürzt.

Die verkürzten Promotoren wurden wiederum in YCplac33 (CEN, *URA3*) vor das *lacZ*-Gen kloniert. Diese Konstrukte wurden in *rib5Δ*-Mutanten transformiert. Mit diesen Zellen wurde mittels der β-Galactosidaseaktivität untersucht, bei welcher Promotorlänge keine riboflavinabhängige Regulation mehr stattfindet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 3-23 dargestellt.

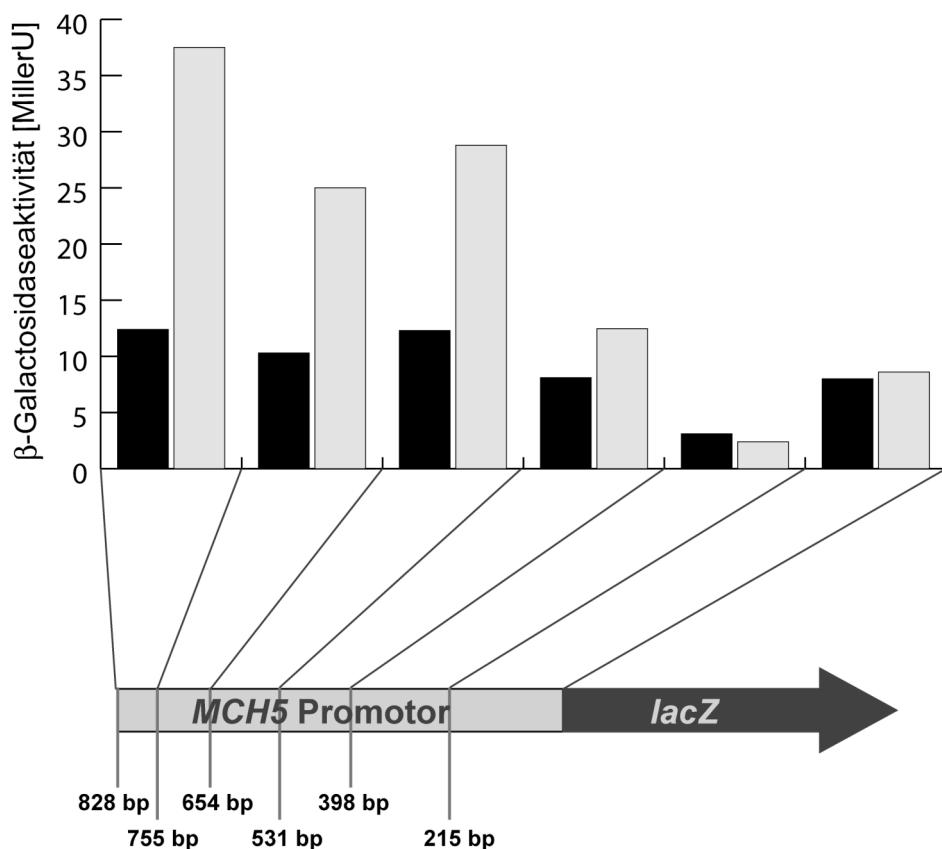


Abb. 3-23: Promotoraktivität der *MCH5*-Promotor-Verkürzungskonstrukte in der *rib5Δ*-Mutante. Die *rib5Δ*-Stämme mit dem *MCH5prom-lacZ*-Reporterkonstrukt und den Promotorverkürzungskonstrukten wurden üN in SD-Medium mit 20 mg/ 1 Riboflavin vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit 200 mg/ 1 Riboflavin (schwarz) bzw. 0,2 mg/ 1 Riboflavin (grau) überimpft und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte durch den Aktivitätstest mit *ortho*-Nitrophenyl-β-D-Galactosid als Substrat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität bereits bei einer Verkürzung des *MCH5*-Promotors auf 531 bp deutlich verringert war, jedoch erfolgt immer noch eine riboflavinabhängige Expression von *MCH5*. Bei Verkürzung des Promoters auf 398 bp war die riboflavinabhängige Regulation stark vermindert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transkriptionsfaktorbindestelle(n) die für die Regulation, in Abhängigkeit von der Riboflavinkonzentration zuständig ist, im Promotorbereich von -531 bp bis -399 bp liegen muss.

3.3.3 *MCH5* wird durch Put3p reguliert

Der *MCH5*-Promotorbereich von -531 bp bis -399 bp wurde auf Homologien zu nahe verwandten Hefen untersucht. Dies führte zur Bestätigung der bereits in Abbildung 3-23 dargestellten Put3p-Bindestelle. Es handelt sich dabei um einen hochkonservierten Bereich, der in Abbildung 3-24 dargestellt ist.

<i>S. cerevisiae</i>	-501	CGGGGGTGGCTTC	CCCG	-486
<i>S. paradoxus</i>	-491	CGGGGGTGGCTTC	CCCG	-476
<i>S. bayanus</i>	-484	CGGGGGTGGCTTC	CCCG	-469
<i>S. mikatae</i>	-470	CGGGGGTGGCTTC	CCCG	-455
<i>S. castellii</i>	-302	CGGGAAACGAATG	CCCG	-287

Abb. 3-24: Konservierter Bereich im *MCH5*-Promotor verwandter Hefen. Die grau unterlegten Bereiche zeigen die konservierten Basen an. Die fettgedruckten Basen zeigen die Put3p-Bindestelle mit dem Motiv CGG(N₁₀)CCG an. Es handelt sich bei diesem stark konservierten Bereich um die Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle.

Im für die riboflavinabhängige Regulation verantwortlichen Promotorbereich konnte die Transkriptionsfaktorbindestelle für Put3p identifiziert werden (Siddiqui und Brandriss 1989). Bei Put3p handelt es sich um den Transkriptionsfaktor, der für die Regulation der Gene *PUT1* und *PUT2* verantwortlich ist. Put1p und Put2p katalysieren die Umsetzung von Prolin als sekundäre Kohlenstoffquelle in Glutamat (Brandriss 1983; Wang und Brandriss 1986). Die Aktivierung von *PUT1* und *PUT2* durch Put3p erfolgt bei einer intrazellulären Prolinakkumulation durch eine Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors durch die Bindung von Prolin (Des Etages *et al.* 2001) und einer Hyperphosphorylierung von Put3p (Huang und Brandriss 2000).

Um zu überprüfen ob die Put3p-Transkriptionsbindestelle im *MCH5*-Promotor funktionell und für die riboflavinabhängige Regulation ausschlaggebend ist, wurde das MCH5prom-lacZ-Konstrukt in *put3Δ-* und *put3Δ rib5Δ*-Mutanten transformiert. Die Regulation des *MCH5*-Promotors wurde in diesen Stämmen mittels des β-Galactosidaseaktivitätstests untersucht (siehe Abbildung 3-25).

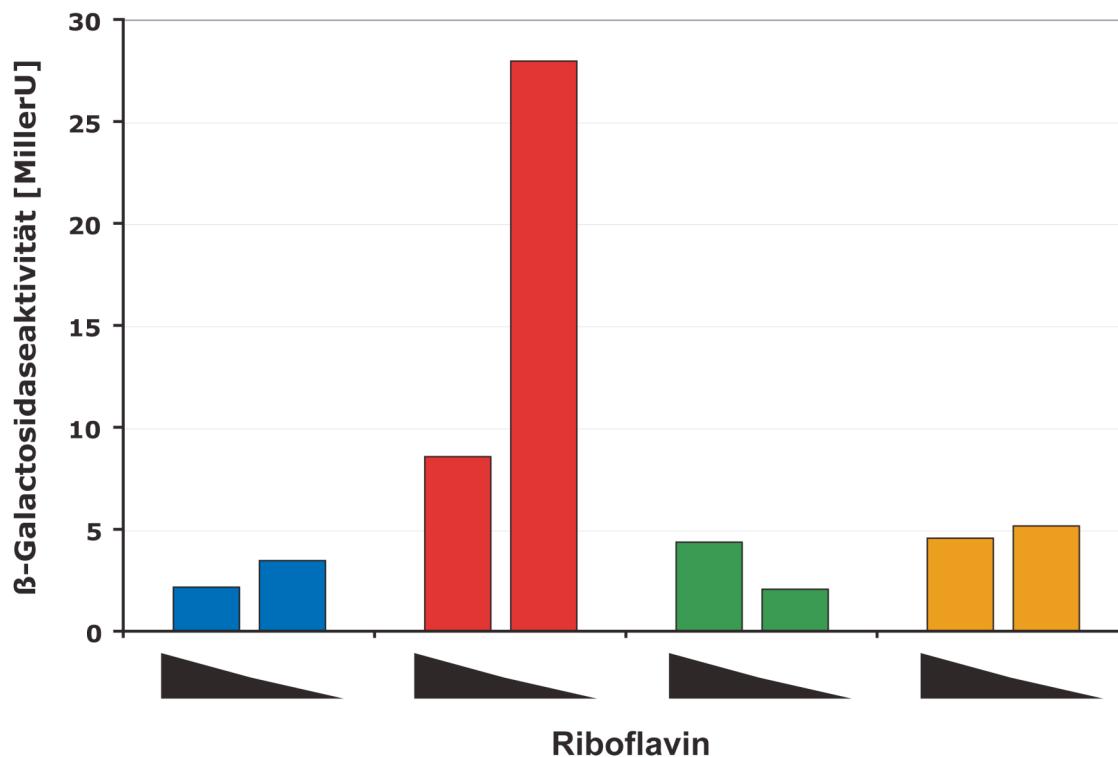


Abb. 3-25: MCH5 Promotoraktivität bei WT (blau), rib5Δ-Mutante (rot) put3Δ-Mutante (grün) und der rib5Δ put3Δ-Doppelmutante (orange) in unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen. Die Zellen mit dem angegebenen Genotyp und dem MCH5prom-lacZ-Konstrukt wurden üN in SD-Medium mit 20 mg/ l Riboflavin vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit 20 oder 0,2 mg/ l Riboflavin (von links nach rechts aufgetragen) überimpft und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte mit dem Aktivitätstest.

Der Test zeigte, dass die Deletion von *PUT3* im WT zu keiner signifikanten Veränderung der lacZ-Expression führte. Die Promotoraktivität lag bei der *put3Δ*-Mutante im Bereich des WT. Wird jedoch *PUT3* in der *rib5Δ*-Mutante deletiert, konnte ein deutlicher Unterschied in der Promotoraktivität, verglichen mit der *rib5Δ*-Einzelmutante, gesehen werden. Während der Promotor bei 0,2 mg/ l Riboflavin in der *rib5Δ*-Einzelmutante stark aktiviert war, konnte in der *rib5Δ put3Δ*-Doppelmutante keine deutliche Erhöhung der Expression festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Put3p-Bindestelle im *MCH5*-Promotor an der Aktivierung der Expression maßgeblich beteiligt ist. Dieses Ergebnis wurde im Folgenden auch noch in einem Wachstumstest untersucht (siehe Abbildung 3-26).

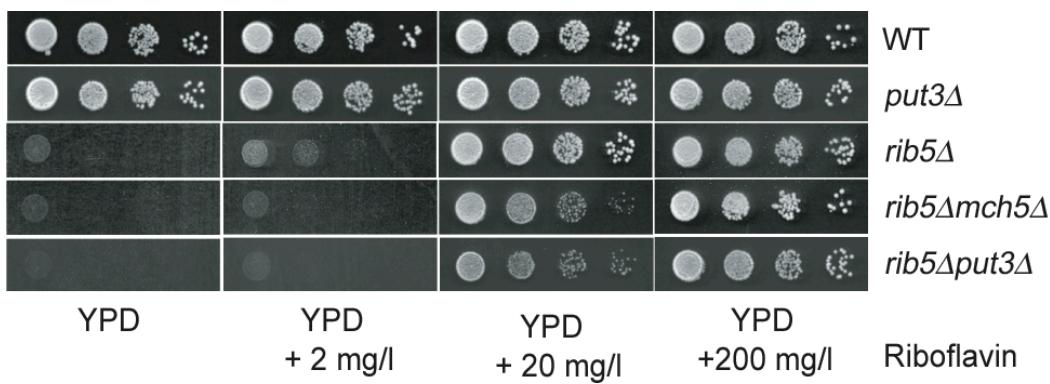


Abb. 3-26: Vergleich des Wachstums vom WT, der *put3Δ*-Mutante, der *rib5Δ*-Mutante, der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante und der *rib5Δ put3Δ*-Doppelmutante. Der Wachstumstest wurde auf YPD durchgeführt. Die Stämme in diesem Wachstumstests haben den BY Stammhintergrund. Die Platten enthalten die oben angegebenen Riboflavinkonzentrationen zusätzlich zu dem bereits in YPD enthaltenen. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Der Wachstumstest zeigte, dass die *put3Δ*-Mutante auf YPD-Platten mit unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen, ebenso wie der Wildtyp, keinen Wachstumsdefekt besitzt. Der Phänotyp der *rib5Δ put3Δ*-Doppelmutante entsprach jedoch dem der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante. Dies lässt vermuten, dass die in der *rib5Δ put3Δ*-Doppelmutante vorhandene Menge von Mch5p wahrscheinlich nicht ausreichte, um genügend Riboflavin ins Innere der Zelle zu transportieren. Damit scheint Put3p tatsächlich an der Regulation des *MCH5*-Promotors beteiligt zu sein. Da sich die *rib5Δ put3Δ*- und *rib5Δ mch5Δ*-Zellen gleich verhalten, scheint *MCH5* bei Abwesenheit von Put3p nicht exprimiert zu werden.

3.3.4 Expression von *MCH5* in Abhängigkeit der Stickstoffquelle

Put3p wird durch intrazelluläres Prolin aktiviert (Des Etages *et al.* 2001). Deshalb wurde im Folgenden die Expression von *MCH5* in verschiedenen Stickstoffquellen untersucht. In SD-Medium sind 38 mM Ammoniumsulfat enthalten. Die anderen untersuchten Stickstoffquellen wurden mit der gleichen Menge an molekularem Stickstoff eingesetzt. Es wurde die Expression von *MCH5* in Medium mit Ammoniumsulfat (38 mM), Harnstoff (17 mM) und Prolin (64 mM) verglichen (siehe Abbildung 3-27).

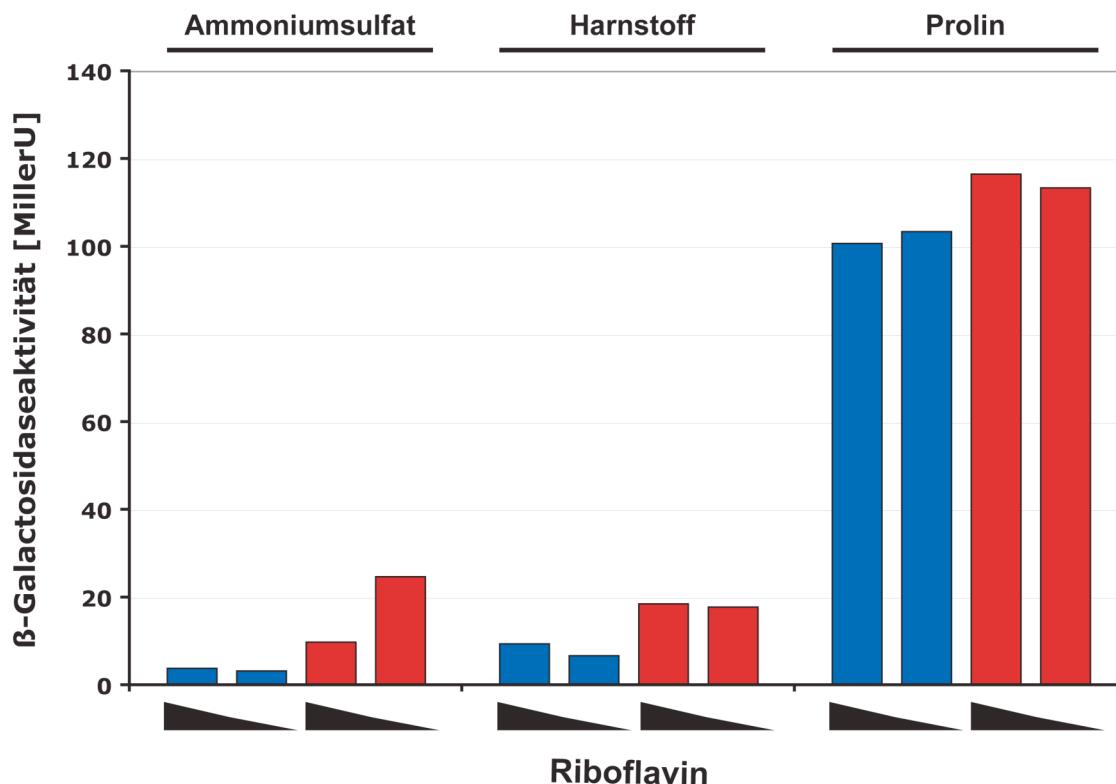


Abb. 3-27: *MCH5*-Promotoraktivität beim WT (blau) und der *rib5Δ*-Mutante (rot) in unterschiedlichen Stickstoffquellen. Die Zellen mit dem angegebenen Genotyp und dem *MCH5*prom-lacZ-Konstrukt wurden üN in SD-Medium mit 20 mg/ l Riboflavin vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit den unterschiedlichen Stickstoffquellen und 20 oder 0,2 mg/ l Riboflavin (von links nach rechts aufgetragen) überimpft und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte mit dem Aktivitätstest.

MCH5 wurde nur in der *rib5Δ*-Mutante mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle riboflavinabhängig exprimiert. In Harnstoffmedium war die *MCH5*-Expression in der *rib5Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht, zeigte aber keine Abhängigkeit von der Riboflavinkonzentration. Das Expressionsniveau lag jedoch in den ammoniumsulfat- und harnstoffhaltigen Medien im gleichen Bereich. Die in Prolin angezogenen Zellen zeigten untereinander alle annähernd die gleiche β-Galactosidaseaktivität und keine riboflavinabhängige Regulation. Im Vergleich zu den in Ammoniumsulfat und Harnstoff kultivierten Zellen wiesen die in Prolin angezogenen eine um mindestens Faktor 6 höhere Expression auf. Dies zeigte, dass *MCH5* durch Prolin sehr viel stärker exprimiert wird als durch die anderen getesteten Stickstoffquellen.

3.3.5 Weitere Untersuchungen zur Aktivierung von *MCH5* durch Put3p

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von *MCH5* in Abhängigkeit von Put3p und Prolin als Stickstoffquelle reguliert wird, wurden weitere Untersuchungen zur prolinabhängigen *MCH5*-Expression durchgeführt. Durch β -Galactosidasetests konnte festgestellt werden, dass in Anwesenheit von Prolin als Stickstoffquelle *MCH5* stärker exprimiert wurde als in Ammoniumsulfat. Zunächst wurde untersucht, ob sich der Wachstumsphänotyp vom WT und der *rib5Δ*-Mutante auf Ammoniumsulfat- und Prolin-Medium unterscheidet (siehe Abbildung 3-28).

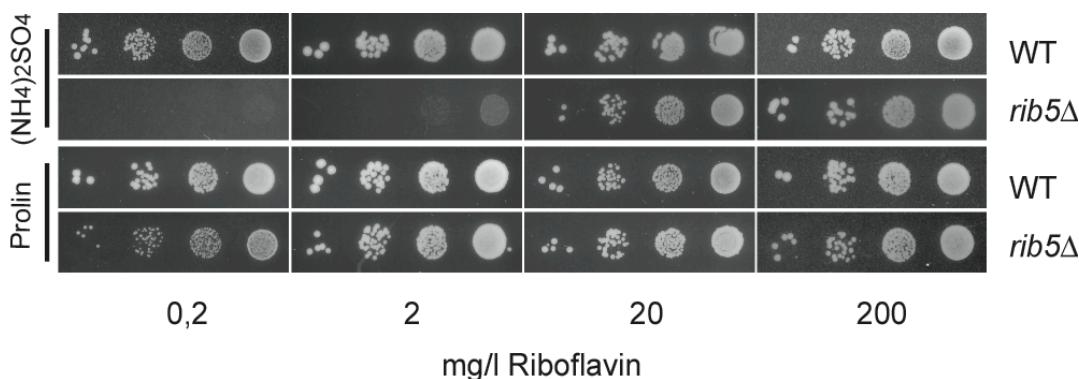


Abb. 3-28: Vergleich des Wachstums vom WT und der *rib5Δ*-Mutante mit Ammoniumsulfat bzw. Prolin als Stickstoffquelle. Der Wachstumstest wurde auf SD-Medium mit Ammoniumsulfat oder Prolin als Stickstoffquelle durchgeführt. Die Stämme in diesem Wachstumstests haben den BY-Stammhintergrund. Die Platten enthalten die oben angegebenen Riboflavinkonzentrationen. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

In diesem Wachstumstest konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der *rib5Δ*-Mutante mit Prolin als Stickstoffquelle deutlich besser war als mit Ammoniumsulfat. Das Wachstum war mit dem der *rib5Δ*-Mutante vergleichbar, die ein *MCH5*-Überexpressionsplasmid trug (siehe Abbildung 3-2). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Expression von *MCH5* durch Prolin als Stickstoffquelle stark erhöht wird und *rib5Δ*-Zellen zu besserem Wachstum verhilft.

Um die Vermittlung der prolinabhängigen Expression durch Put3p zu beweisen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde das *MCH5*prom-lacZ-Konstrukt zunächst in einen Stamm, in dem Put3p keiner Aktivierung durch Prolin bedarf (*PUT3c*), und den korrespondierenden WT (erhalten von Des Etages *et al.* (2001)) transformiert. Die β -Galactosidaseaktivität wurde in SD-Medium mit Ammoniumsulfat bzw. Prolin als Stickstoffquelle bestimmt (siehe Abbildung 3-29).

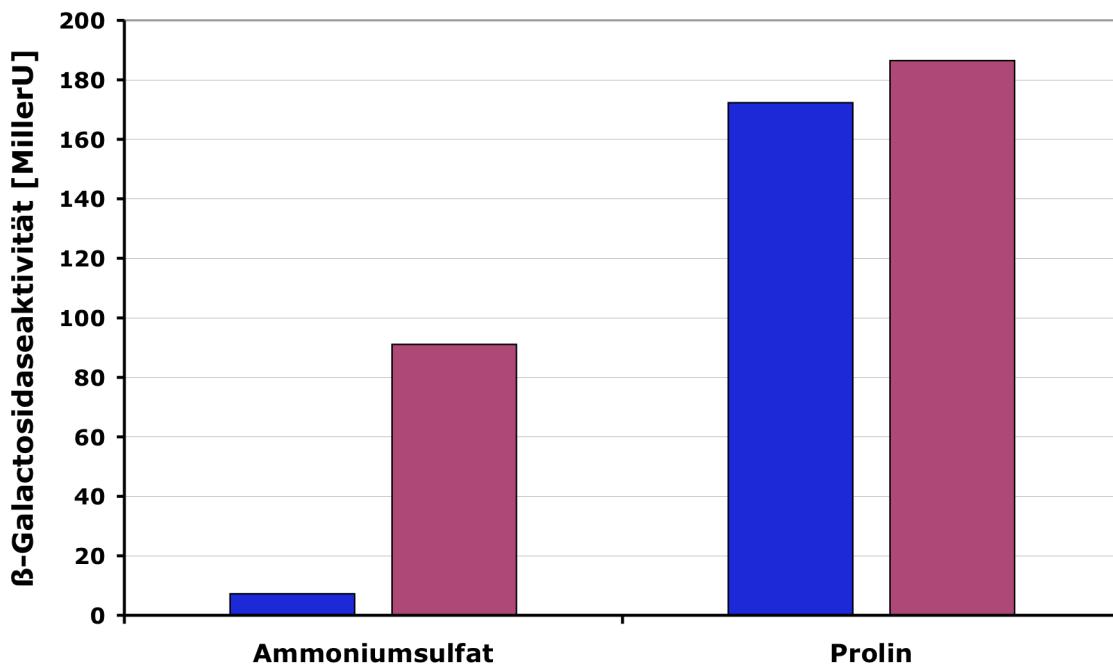


Abb. 3-29: *MCH5* Promotoraktivität im WT (blau) und dem *PUT3c*-Stamm (violett) in unterschiedlichen Stickstoffquellen. Die Zellen mit den angegebenen Genotypen und dem *MCH5*prom-lacZ-Reporterkonstrukt wurden üN in SD-Medium vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit Ammoniumsulfat bzw. Prolin als Stickstoffquelle überimpft und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte mit dem Aktivitätstest.

In diesem Test konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MCH5* in dem *PUT3c*-Stamm auch mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle stark erhöht ist. Zwar wurde die Expression von *MCH5* durch Prolin im *PUT3c*-Stamm stärker stimuliert, jedoch konnte diese Beobachtung auch von Des Etages *et al.* (2001) bei der Untersuchung der *PUT2*-Expression gemacht werden. Da die Expression von *MCH5* in *PUT3c*-Stämmen durch Prolin noch deutlich gesteigert wurde scheint das Maximum der Regulation durch Put3p noch nicht vorzuliegen. Es konnte jedoch mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die Expression von *MCH5* in *PUT3c*-Stämmen in ammoniumsulfathaltigem SD-Medium stark erhöht war. Dies lässt darauf schließen, dass Put3p der Hauptregulator von *MCH5* ist.

Um zu untersuchen, ob die Regulation durch Put3p an der in Kapitel 3.3.3 identifizierten Transkriptionsfaktorbindestelle stattfindet, wurde diese Stelle im *MCH5*-Promotor durch andere Basen ausgetauscht. Der Promotor mit der mutierten Transkriptionsfaktorbindestelle wurde in dem Vektor YCplac33 (CEN, *URA3*) vor das *lacZ*-Gen kloniert (im Folgenden als *MCH5*prom/mut-lacZ benannt). Dieses Reporterkonstrukt wurde in WT- und *rib5Δ*-Zellen transformiert. Die β-Galaktosidaseaktivität dieser Stämme wurde dann nach Anzucht in ammoniumsulfat- bzw. prolinhaltigem SD-Medium mit unterschiedlichen Riboflavin-konzentrationen untersucht (siehe Abbildung 3-30).

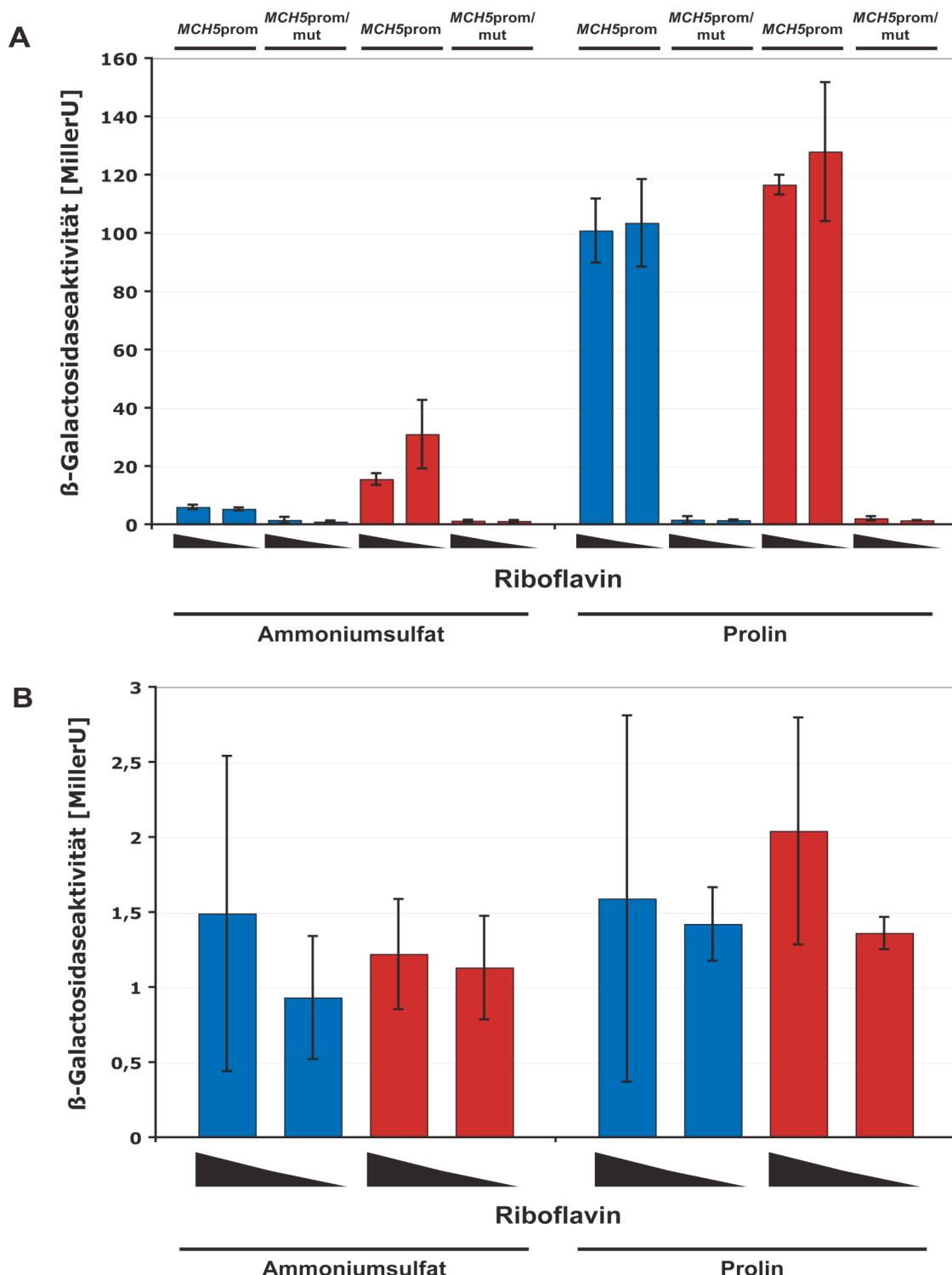


Abb. 3-30: Abhängigkeit der MCH5-Promotoraktivität von der Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle. Die WT-Zellen (blau) mit dem MCH5prom-lacZ- und dem MCH5prom/mut-lacZ-Konstrukt und die rib5 Δ -Zellen (rot) mit dem MCH5prom-lacZ- und dem MCH5prom/mut-lacZ-Konstrukt wurden üN in SD-Medium mit 20 mg/ l Riboflavin vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit Ammoniumsulfat bzw. Prolin als Stickstoffquelle und 20 oder 0,2 mg/ l Riboflavin (von links nach rechts aufgetragen) überimpft. Sie wurden für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität erfolgte mit dem Aktivitätstest. In A sind die Werte für das MCH5prom-lacZ- und dem MCH5prom/mut-lacZ-Reporter dargestellt. In B sind zur Verdeutlichung nur die Werte des mutierten Promoters dargestellt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen.

Es konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Regulation des *MCH5*-Promotors an der identifizierten Transkriptionsfaktorbindestelle stattfindet. Nach dem Austausch der Put3p-Bindestelle durch andere Basen konnte die Expression von *MCH5* weder durch niedrige Riboflavinkonzentrationen noch durch Prolin erhöht werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von *MCH5* hauptsächlich an dieser Transkriptionsfaktorbindestelle durch Put3p reguliert wird.

3.3.6 Untersuchungen zur Riboflavinwahrnehmung über die intrazelluläre Prolinkonzentration

Nachdem die Expression von *MCH5* durch Prolin über den Transkriptionsfaktor Put3p belegt wurde, trat die Vermutung auf, dass die Regulation der Expression von *MCH5* in Abhängigkeit von verfügbarem Riboflavin ebenfalls durch Put3p vermittelt wird.

Die Degradation von Prolin zu der verwertbaren Stickstoffquelle Glutamat erfolgt nach dem Import in die Mitochondrien in drei Schritten (Brandriss und Krzywicki 1986; Cooper 1982; Krzywicki und Brandriss 1984). Im ersten Schritt wird Prolin durch Put1p, die Prolinoxidase, zu Δ-Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) abgebaut (Wang und Brandriss 1987). Im zweiten Schritt wird P5C unkatalysiert zu Glutamatsemialdehyd umgesetzt. Der dritte Schritt der Degradation wird durch Put2p, die P5C-Dehydrogenase, katalysiert (Brandriss 1983). Sie setzt das Glutamatsemialdehyd zum verwertbaren Glutamat um. Bei der Prolinoxidase handelt es sich um ein FAD-abhängiges Enzym. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PUT1* in einer *rib5Δ*-Mutante um den Faktor 3 erhöht ist (siehe Kapitel 3.2). Der Abbauweg von Prolin zu Glutamat ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

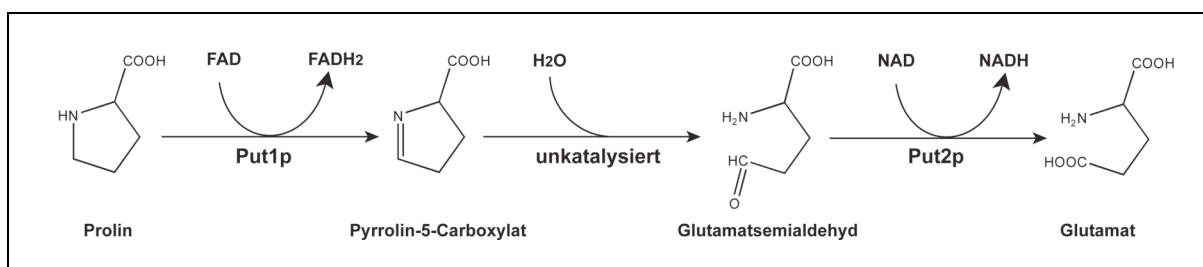


Abb. 3-31: Abbau von Prolin zu Glutamat in *S. cerevisiae*.

Als ein möglicher Mechanismus zur Riboflavinwahrnehmung ist vorstellbar, dass diese durch die Aktivität von Put1p erfolgen könnte. Da FAD das Coenzym der Prolinoxidase ist, könnte bei einer geringen intrazellulären Riboflavinkonzentration und der daraus resultierenden geringen FAD-Konzentration die Fähigkeit zur Prolinegradation verloren gehen. Dadurch würde es zu einer Akkumulation von Prolin kommen welches wiederum zu einer Aktivierung der Transkription der Put3p-abhängigen Gene führt.

Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von *MCH5* in einem Stamm analysiert, der einen Defekt im *FADI*-Gen hat. Da es sich bei *FADI* um ein essentielles Gen handelt, wurde der Promotor von *FADI* im Genom durch den Promoter des *GAL1*-Gens ersetzt (der Stamm wird im Folgenden GALprom-FAD1 genannt). Die Expression von *FADI* kann somit auf Medium mit Glucose reprimiert werden, was einen FAD-Mangel bedingen sollte. Das *MCH5*prom-lacZ-Reporterkonstrukt wurde in den GALprom-FAD1-Stamm transformiert und die Expression von *MCH5* zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums auf Glucose mittels des β-Galaktosidasetests überprüft. Bei diesem Experiment konnten keine Unterschiede zwischen den in Galactose und Glucose kultivierten Stämmen festgestellt werden. Möglicherweise ist Fad1p so stabil, dass es sehr lange dauert bis in den Stämmen ein signifikanter FAD-Mangel auftritt. Nachdem der GALprom-FAD1-Stamm solange in Glucosemedium überimpft wurde bis er nicht mehr wachsen konnte, war auch keine erhöhte *MCH5*-Expression messbar. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen in diesem Stadium nicht mehr lebensfähig waren und deshalb keine Expression von *lacZ* zeigten.

Nachdem das Experiment mit dem GALprom-FAD1-Stamm keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, wurde die Expression von *MCH5* in *put1Δ*- und *put2Δ*-Mutanten untersucht. Diese Stämme sollten durch die Deletion der Degradationsgene Prolin bzw. Glutamatsemialdehyd akkumulieren.

Der Import von Prolin in die Zellen erfolgt hauptsächlich über die durch Prolin als Stickstoffquelle exprimierten Transportproteine Gap1p (general amino acid permease 1) und Put4p (proline utilisation 4) (Jauniaux und Grenson 1990; Jauniaux *et al.* 1987). Es wurde beschrieben, dass diese Transportproteine durch die Zugabe einer guten Stickstoffquelle wie Ammoniumsulfat rasch inaktiviert werden (Grenson 1983; Grenson 1992; Wiame *et al.* 1985). Jedoch konnte von Lasko und Brandriss (1981) gezeigt werden, dass eine *gap1Δ put4Δ*-Doppelmutante noch auf Prolin wachsen konnte, was auf das Vorhandensein weiterer Transportproteine für Prolin hindeutet.

Die Expression von *MCH5* wurde im WT und den *put1Δ*- und *put2Δ*-Mutanten in Abhängigkeit vom extrazellulären Prolin/ Ammoniumsulfat-Verhältnis untersucht (siehe Abbildung 3-32).

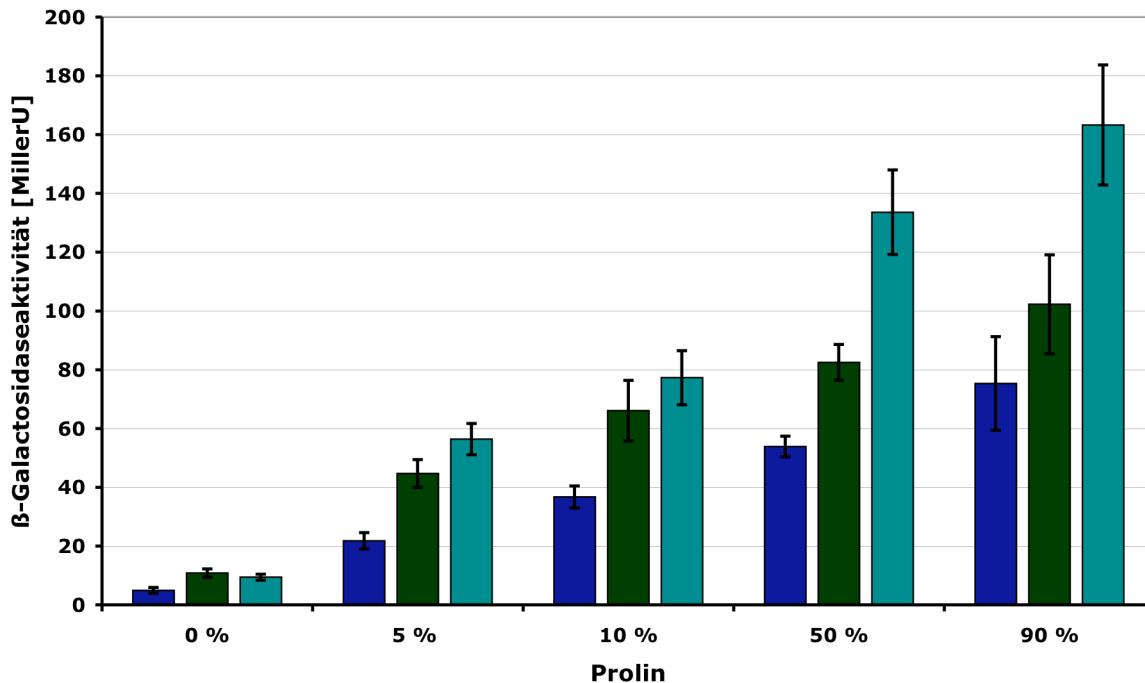


Abb. 3-32: *MCH5*-Promotoraktivität beim WT (blau), der *put1Δ*- (dunkelgrün) und der *put2Δ*-Mutante (blaugrün) in unterschiedlichen Prolinkonzentrationen. Die Zellen mit dem angegebenen Genotyp und dem *MCH5*prom-lacZ-Reporterkonstrukt wurden üN in SD-Medium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle vorinkubiert. Für den Test wurden sie mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in SD-Medium mit 80 mM Stickstoff aus den angegebenen Prozent Prolin und ad 100 Prozent Ammoniumsulfat überimpft und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität erfolgte mit dem Aktivitätstest. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen.

Es wurde nachgewiesen, dass die Expression von *MCH5* in der *put1Δ*- und *put2Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist wenn Prolin im Medium vorhanden ist. Der Import von Prolin erfolgt in Ammoniumsulfat, vermutlich ausschließlich über die Transportproteine Agp1p und Gnp1p (Andreasson *et al.* 2004). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Wahrnehmung von niedrigen Riboflavinkonzentrationen über die FAD abhängige Aktivität von Put1p erfolgt. Es ist jedoch unklar, warum die Deletion von *PUT2* zu einer noch höheren Expression von *MCH5* führt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Glutamatsemialdehyd zu einer stärkeren Aktivierung des Transkriptionsfaktors Put3p führt als Prolin.

Es wird vermutet, dass Put1p eine geringe Affinität zu FAD hat und somit FAD für die Prolinoxidase erst zur Verfügung steht, wenn andere FAD-tragende Enzyme abgesättigt sind. Da die Prolinoxidase erst aktiv ist wenn FAD gebunden wurde, könnte eine zu niedrige intrazelluläre FAD-Konzentration zu einer Akkumulation von Prolin führen. Intrazellulär angehäuftes Prolin wiederum induziert durch Put3p die Transkription der Prolin-degradationsgene und des Gens für den Riboflavinimport.

Um zu untersuchen, ob die Zugabe von FAD die Aktivität von Put1p nach einer Sättigungs-kinetik katalysiert, wurde Put1p (ohne die mitochondrielle Signalsequenz) im Vektor pMAL-c2x an das Maltosebindeprotein fusioniert (im Folgenden pMALc2x-Put1p genannt). Dieser Vektor und der leere Vektor (als Negativkontrolle) wurden zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Mit dem isolierten Protein sollte die Bindekinetik von FAD an Put1p mittels des Prolinoxidasetests (siehe Kapitel 2.2.3.10) ermittelt werden. In einem SDS-Gel konnte gezeigt werden, dass das Protein in *E. coli* nach der Induktion durch IPTG exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Der Rohextrakt aus *E. coli* mit pMALc2x und pMALc2x-Put1p wurde im Prolinoxidasetest eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass im Extrakt mit leerem Vektor keine Prolinoxidaseaktivität vorhanden war. Im Put1p exprimierenden Stamm konnte eine von der eingesetzten Proteinmenge abhängige Prolinoxidase-Aktivität gezeigt werden (siehe Tabelle 3-7).

Eingesetzte Proteinmenge [µg]	Extinktion	U [nmol P5C /min]	U/mg [µmol P5C /min*mg]
2,5	0,032	22,20	8,88
5	0,063	43,75	8,75
10	0,138	95,85	9,59

Tab. 3-6: Prolinoxidaseaktivität von heterolog exprimiertem Put1p in *E. coli*. Aus dem MBP-Put1p-exprimierenden *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde ein Proteinrohextrakt hergestellt. Der Rohextrakt wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in den Prolinoxidasetest eingesetzt.

Der Test zeigte, dass das in *E. coli* exprimierte Put1p aktiv ist und je nach Protein-Konzentration eine unterschiedliche Umsatzgeschwindigkeit von Prolin zu P5C hatte. Es wurde versucht, die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe von verschiedenen FAD-Konzentrationen zu erhöhen. Die Zugabe von FAD führte jedoch nicht zu einem schnelleren Umsatz. Dies könnte wohl damit erklärt werden, dass der BL21(DE3)-Stamm eine intakte Riboflavinbiosynthese hat und das Enzym bereits mit FAD abgesättigt war. Um das FAD von Put1p zu trennen, könnte beispielsweise dialysiert werden, jedoch wurde von Brandriss

und Magasanik (1979) beschrieben, dass die Prolinoxidase sehr instabil ist und rasch an Aktivität verliert. Eine weitere Möglichkeit die Prolinoxidase ohne bzw. mit wenig FAD zu erhalten, wäre die Expression in einem *E. coli*-Stamm mit defekter Riboflavinbiosynthese. Die Untersuchung von heterolog exprimierten Put1p soll durch weitere Arbeiten fortgeführt werden.

3.4 Herstellung eines Antikörpers gegen Mch5p

Wie bereits in Kapitel 3.1.4 gezeigt, konnte in *MCH5*-überexprimierenden *S. cerevisiae*-Stämmen eine Aufnahme von Riboflavin erst nach einer Verarmung von mindestens acht Stunden gemessen werden. Da *MCH5* auf dem Plasmid konstitutiv exprimiert ist und dies deswegen nicht durch die genetische Kontrolle verursacht werden kann, könnte zusätzlich eine posttranskriptionale Regulation der Riboflavinaufnahme erfolgen. Im heterologen Expressionssystem in *S. pombe* war keine Riboflavindepletion notwendig, das heißt eine Regulation durch das vorhandene Riboflavin müsste speziell in *S. cerevisiae* erfolgen. Eine weitere Erklärung warum es in *S. pombe* nicht nötig ist die Zellen an Riboflavin zu verarmen könnte sein, dass in diesen Hefen durch die Biosynthese weniger Riboflavin produziert wird und deshalb in niedrigerer intrazellulärer Konzentration vorliegt.

Gegebenenfalls erreicht das überexprimierte Mch5p die Plasmamembran nicht, wird abgebaut oder über einen anderen Mechanismus in einer inaktiven Form gehalten. Da die Herstellung von Fusionsproteinen mit Epitopen bei Mch5p schwierig ist, sollte ein polyklonales Antiserum gegen Mch5p hergestellt werden. Mit dem Antiserum wäre es dann möglich, durch Dichtegradientenzentrifugationen und indirekte Immunfluoreszenz-Experimente von in verschiedenen Medien angezogenen Zellen zu sehen, in welcher Membran Mch5p lokalisiert ist. Weiterhin könnte mit diesem Antiserum die Menge des vorhandenen Proteins in Westernblots bestimmt werden. Mit dem Antiserum könnte Mch5p auch immunoisoliert werden und auf mögliche post-transkriptionale Modifikationen untersucht werden.

Wie im Hydropathieplot in Abbildung 3-3 zu sehen ist, besitzt Mch5p eine etwa 100 Aminosäuren lange N-terminale Domäne vor der ersten Transmembrandomäne. Dieser Bereich sollte sich für eine Expression in *E. coli* besonders gut eignen. Zunächst wurden die ersten 104 Aminosäuren ohne Startmethionin in den Vektor pTrcHisA kloniert, wodurch eine Fusion an den His-Tag erhalten werden sollte. Das daraus resultierende Protein war jedoch unlöslich (Daten nicht gezeigt). Um eine erhöhte Löslichkeit des Proteins zu erhalten,

wurde der N-terminale Bereich von Mch5p an das Maltosebindeprotein im Vektor pMAL-c2x fusioniert. Von diesem Konstrukt (pMAL-c2x-MCH5) konnte nach einer Induktion der Expression mit IPTG eine ausreichende Menge des Maltosebindeprotein-Mch5p- (MBP-Mch5p) Fusionsproteins in löslicher Form erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Das MBP-Mch5p-Fusionsprotein wurde in *E. coli*-Zellen exprimiert und über eine Amylosesäule aufgereinigt (siehe Abbildung 3-33).

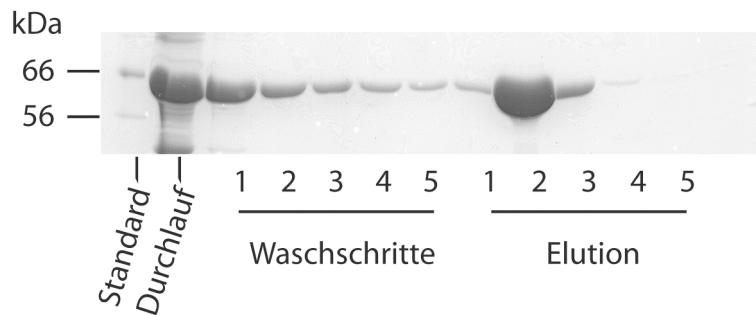


Abb. 3-33: Aufreinigung von MBP-Mch5p über eine Amylosesäule. Die Proteine von dem MBP-Mch5p exprimierenden BL21(DE3) *E. coli*-Stamm wurden an eine Amylosesäule gebunden. Vom Durchlauf, den Waschschritten und den Elutionsschritten wurden Aliquots auf einem 10 %igen SDS Gel auf ihre Reinheit überprüft. Im Durchlauf konnten nicht gebundenes MBP-Mch5p und andere Proteine detektiert werden. Die Säule wurde fünfmal mit je 1,5 ml Säulenpuffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine abzutrennen. Die Elution von MBP-Mch5p von der Säule erfolgte mit 10 mM Maltose im Säulenpuffer. Der Großteil des Proteins war in der zweiten Fraktion der Elution zu finden.

Die Elutionsfraktion 2 hatte eine Proteinkonzentration zwischen 2,5 und 5 mg/ 1 MBP-Mch5p. Diese Konzentration reicht zur Herstellung eines Antikörpers aus. Diese Proteinlösung wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Kaninchen wurden zunächst der Primärimmunisierung unterzogen, nach 20, 30, 40 und 61 Tagen folgten sogenannte „Boost“-Immunisierungen. Am 61. Immunisierungstag wurde Blut entnommen, das in der Westernblotanalyse auf seine Spezifität untersucht wurde. In Mch5p überexprimierenden Stämmen konnte ein Signal beobachtet werden, das jedoch stark von Kreuzreaktionen überlagert wurde. Die Kaninchen wurden deswegen weiter immunisiert und am 90. Immunisierungstag erneut Blut entnommen. Im Westernblot wurde kein stärkeres Signal als am 60. Immunisierungstag erhalten. Die Immunisierung der Kaninchen wurde daher fortgesetzt und die Analyse der Antiseren aus späteren Immunisierungen und die Aufreinigung des Mch5p-Antikörpers in einer Diplomarbeit fortgeführt.

4 Diskussion

4.1 Riboflavintransport in *S. cerevisiae*

Riboflavin spielt in Form der Cofaktoren FMN und FAD, bei vielen Reaktionen eine sehr wichtige Rolle. FMN und FAD sind beispielsweise an der Dehydrogenierung von Metaboliten, der Elektronenübertragung in Redoxreaktionen und der Aktivierung von Sauerstoff für Oxidations- und Hydroxylierungsreaktionen beteiligt. Obwohl die meisten niederen Eukaryonten im Gegensatz zu Säugern riboflavinprototroph sind, konnte bei beiden der Import von Riboflavin über die Plasmamembran gezeigt werden (Förster *et al.* 2001; Perl *et al.* 1976; Said *et al.* 2000; Sibirnyi *et al.* 1977). Bislang konnte allerdings nur bei den Bakterien *B. subtilis* und *L. lactis* mit intakter Riboflavinbiosynthese eine Riboflavin-aufnahme beschrieben werden (Burgess *et al.* 2006; Cecchini *et al.* 1979).

4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mch5p, dem Riboflavintransportprotein

Um den Plasmamembrantransporter für Riboflavin in *S. cerevisiae* zu finden, wurde eine Mutante die einen Defekt in der Riboflavinbiosynthese besitzt mit einer Multicopy-Genbank transformiert. Es wurde nach Genen gesucht, die den riboflavinabhängigen Wachstumsphänotyp der Mutante mildern konnten. Dies führte zur Identifikation von Mch5p, einem Protein mit zwölf vorhergesagten Transmembrandomänen. Es gehört zu einer Familie von fünf Proteinen in Bäckerhefe, die schwache Homologien zu den menschlichen Monocarboxylattransportern MCT1-MCT7 und MCT8 (auch bekannt als XPCT) zeigen (Bonen *et al.* 2006).

Erste Hinweise, dass es sich um einen Vitamin B₂-Transporter handeln könnte, lieferte zum einen die Komplementation des *rib*-Wachstumsphänotyps durch die Überexpression von *MCH5*, zum anderen die Verschlechterung des Wachstums auf niedrigen Riboflavin-konzentrationen durch gleichzeitige Deletion von *MCH5* und einem Biosynthesegen. Verzögerungen FAD-abhängiger intrazellulärer Prozesse in der *rib5Δ mch5Δ*-Doppelmutante, verglichen mit der *rib5Δ*-Einfachmutante, deuteten auf eine Unterversorgung der Zelle mit B₂-Derivaten und damit auf eine Beteiligung von Mch5p am Riboflavinimport hin. Sowohl durch eine Saccharosedichthegradientenzentrifugation als auch durch indirekte Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Mch5p in der Plasmamembran von *S. cerevisiae*

lokalisiert ist. Diese vorangegangenen Ergebnisse waren starke Hinweise, dass es sich bei Mch5p um den Plasmamembrantransporter für Riboflavin handelt. Um dies zu beweisen, wurde in *MCH5*-überexprimierenden *S. cerevisiae ribΔ*-Zellen die Aufnahme von radioaktiv markiertem Riboflavin gemessen. Dies erwies sich zunächst als schwierig, da der Import von Riboflavin nur in *rib4Δ*-Stämmen (die *MCH5* stark überexprimieren) und erst nach einer mindestens achtstündigen Verarmung an Riboflavin gemessen werden konnte. Andere Biosynthesemutanten von *S. cerevisiae* zeigten keinen Import von Riboflavin. In *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen konnte dagegen eine Aufnahme von Riboflavin nachgewiesen werden. Letztlich kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass es sich bei Mch5p um einen positiven Regulator des Riboflavintransporters und nicht um den Riboflavintransporter selbst handelt. Wenn dies der Fall wäre, müsste es in *S. pombe* ein Transportprotein geben, das nahezu identische kinetische Konstanten wie der Transporter in Bäckerhefe hat. *S. pombe* und *S. cerevisiae* sind nur sehr entfernt miteinander verwandt; in *S. pombe* gibt es keine homologen Gene zu den *MCH*-Genen. Es wäre deshalb sehr verwunderlich, wenn es sich bei Mch5p um einen Regulator handeln würde. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei Mch5p um den Riboflavinplasmamembrantransporter handelt. Mch5p zeigt im Hydropathieplot zwölf Transmembrandomänen, während für die bakteriellen Riboflavintransporter YpaA und RibU lediglich fünf Transmembrandomänen vorhergesagt werden (Burgess *et al.* 2006). Da fünf Transmembrandomänen für Transportproteine ungewöhnlich sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine als Dimere vorliegen.

Die Aufnahme von Riboflavin in *S. cerevisiae* wurde zuvor von Perl *et al.* (1976) untersucht. Die Autoren beschrieben, dass eine Riboflavinaufnahme nur in Biosynthesemutanten, die bei anaerober Anzucht in der mittellogarithmischen Phase geerntet wurden, messbar war. Diese Aufnahme konnte jedoch, trotz identischer Anzucht- und Aufnahmetestbedingungen, in *rib4Δ*- und *rib5Δ*-Zellen nicht reproduziert werden. Allerdings konnten die von Perl *et al.* (1976) für diese Aufnahmetests verwendeten Stämme nicht untersucht werden.

Die kinetischen Konstanten von Mch5p wurden durch Aufnahmetests in *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Zellen untersucht. Diese Zellen mussten vor dem Test nicht riboflavinverarmt werden und zeigten eine höhere Riboflavinaufnahme als die *S. cerevisiae*-Zellen. Von Perl *et al.* (1976) wurde beschrieben, dass es sich bei der Riboflavinaufnahme in *S. cerevisiae* um einen hochaffinen Prozess mit einem K_m -Wert von 15 µM und einem pH-Optimum von 7,5 handelt. Der Transport wird nur von sehr wenigen Substratanaloga kompetitiert und kann durch Zugabe von Glucose nicht stimuliert werden. Bei den

Untersuchungen der Riboflavinaufnahme durch heterolog in *S. pombe* exprimiertes *MCH5* konnte bereits dargestellt werden, dass dessen kinetische Konstanten gut mit den von Perl *et al.* (1976) in *S. cerevisiae* beschriebenen Werten übereinstimmen.

Der Transport zeigte eine Sättigungskinetik mit einem K_m -Wert von $17 \pm 6 \mu\text{M}$ und ebenfalls ein pH-Optimum von 7,5. Die Riboflavinaufnahme wurde durch die Zugabe der Riboflavin-analoga Lumichrom, Acriflavin und unmarkiertem Riboflavin kompetitiert. FMN und FAD konkurrieren jedoch nicht mit Riboflavin um die Aufnahme durch Mch5p. Die Aufnahme von Riboflavin wurde auch durch Zugabe von Protonophoren nicht signifikant inhibiert. Zwar ist durch Zugabe von FCCP ein Rückgang der Aufnahmgeschwindigkeit auf 65 % zu sehen, jedoch konnte auch bei der Untersuchung der Aufnahme von Glucose, die durch die bekannten Uniporter der Hxtp-Familie katalysiert wird (Kruckeberg 1996), durch FCCP eine Reduktion der Aufnahmgeschwindigkeit auf 69 % gezeigt werden. Durch die Zugabe von FCCP konnte bei der durch den Protonensymporter Vht1p katalysierten (Stolz *et al.* 1999) Aufnahme von Biotin eine deutlich stärkere Reduktion der Aufnahmgeschwindigkeit auf 25 % gemessen werden. Die bei Mch5p ermittelte Reduktion der Aufnahmgeschwindigkeit durch Protonophoren ist somit als nicht signifikant zu sehen. Dies deutet bereits darauf hin, dass es sich um einen Uniporter handeln könnte. Um weitere Informationen über den Transportmechanismus von Mch5p zu erhalten, wurde der Einfluss von energetisierenden Substanzen untersucht. Glucose aktiviert die Plasmamembran-ATPase (Pma1p) und erhöht somit die Aufnahmgeschwindigkeit von Protonensymportern (Serrano 1983). Auch die Zugabe von Ethanol aktiviert die Protonen-ATPase und erhöht somit die Aktivität von protonenabhängigen Transportvorgängen (Sauer *et al.* 1990). Weder durch Zugabe von Glucose noch von Ethanol konnte für den durch Mch5p katalysierten Transport eine Stimulation der Aufnahme beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Mch5p die Aufnahme von Riboflavin nicht durch einen aktiven Transportvorgang, sondern durch eine erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten katalysiert. Dies ist auch eine mögliche Erklärung weshalb es nötig ist, die Zellen an Riboflavin zu verarmen um Aufnahme messen zu können. Möglicherweise liegt in *S. pombe* bereits durch eine verringerte Biosynthese weniger Riboflavin vor, weshalb die Riboflavinaufnahme in *MCH5*-exprimierenden *S. pombe*-Wildtypzellen ohne eine Verarmung an Riboflavin erfolgen kann.

Die Genome des filamentösen Pilzes *A. gossypii* und der Hefe *S. cerevisiae* weisen große Homologien auf, jedoch sind keine Proteine kodiert die große Identität zu Mch5p haben (Hermida *et al.* 2005). Zwar sind drei Proteine mit Homologie zu den Mch-Proteinen kodiert, jedoch zeigen diese eine deutlich stärkere Identität (50-38 %) zu Mch4p. Obwohl bei

A. gossypii Riboflavinaufnahme beschrieben wurde, ist es unwahrscheinlich, dass diese über ein Mch5p-Homologes erfolgt. Die kinetischen Konstanten des Transports unterscheiden sich deutlich von denen in *S. cerevisiae* (Förster *et al.* 2001). Die Autoren konnten einen ähnlichen K_m -Wert von 40 µM zeigen, jedoch war die Aufnahme durch Protonophoren hemmbar und die Riboflavinaufnahme durch FMN und FAD kompetitierbar. Folglich scheint der Riboflavintransport in *A. gossypii* über ein anderes Protein zu erfolgen.

Eventuell existieren in *S. cerevisiae* posttranskriptionale Mechanismen, die eine Aufnahme von Riboflavin durch Mch5p unter Normalbedingungen verhindern. Dies sollte durch weitere Arbeiten mit einem Mch5p spezifischem Antiserum analysiert werden. Zur Herstellung dieses Antiseraums wurde die N-terminale Domäne von Mch5p an das Maltosebindeprotein fusioniert, das Protein gereinigt und Kaninchen damit immunisiert. Die Aufreinigung des Antiseraums und nachfolgende Untersuchungen werden in weiteren Arbeiten erfolgen.

Für die Riboflavinaufnahme in Sägerzellen wurde beschrieben, dass Riboflavin direkt nach dem Import zu FMN und FAD phosphoryliert wird (Gastaldi *et al.* 2000). Es ist jedoch unklar, ob die Energieabhängigkeit der Riboflavinaufnahme in diesen Zellen durch einen Protonensymportmechanismus bedingt wird oder ob die Energetisierung für die Phosphorylierung nach dem Import benötigt wird. Die rasche Umsetzung des importierten Riboflavins zu FMN und FAD konnte auch für *B. subtilis* gezeigt werden (Cecchini *et al.* 1979). Da der Import von Riboflavin über Mch5p energieunabhängig erfolgt erscheint es unwahrscheinlich, dass es direkt nach der Aufnahme zu FMN und FAD umgesetzt wird. Da es sich bei dem Mch5p katalysierten Transport um einen Uniport handelt wäre es jedoch sinnvoll, Riboflavin zu FMN oder FAD umzusetzen um einen Export von Riboflavin zu vermeiden. Von einigen Organismen ist es bekannt, dass sie Riboflavin überproduzieren und in das umgebende Medium sekretieren (Förster *et al.* 2001; Perl *et al.* 1976; Sibirnyi *et al.* 1977). Mittels Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass radioaktiv markiertes Riboflavin mindestens eine Stunde nach der Aufnahme in *S. cerevisiae* hauptsächlich in der unphosphorylierten Form vorliegt. Das importierte Riboflavin muss folglich über einen anderen Mechanismus als durch Phosphorylierung in der Zelle gehalten werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich sowohl in Säugern als auch in *B. subtilis* um ein deutlich anderes Riboflavintransportsystem als in *S. cerevisiae* handelt.

4.1.2 Funktionen von Mch5p-Homologen

Mch5p aus *S. cerevisiae* gehört zu einer Familie von fünf homologen Proteinen (Mchp-Familie) (Makuc *et al.* 2001) und katalysiert die Aufnahme von Riboflavin. Die Expression von Mch1p, Mch2p, Mch3p und Mch4p in *rib5Δ*-Mutanten erbrachte keine Hinweise für eine Beteiligung am Transport von Riboflavin. In den nahe verwandten Hefen *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae* und *Saccharomyces bayanus* sind Mch1p, Mch4p und Mch5p hochkonserviert, während Mch2p und Mch3p nur geringe Identität zu den Proteinen in *S. cerevisiae* zeigen (Cliften *et al.* 2003; Kellis *et al.* 2003). Da Mch2p und Mch3p schwächer exprimiert sind als Mch5p und Mch4p (Makuc *et al.* 2001) besteht die Möglichkeit, dass erstere keine wichtigen Funktionen haben und sich deren Sequenzen deshalb auseinander entwickelt haben. Für Mch5p wurden in oben genannten Hefen Identitäten zwischen 94 und 87 % ermittelt. (Cliften *et al.* 2003; Kellis *et al.* 2003). Diese Hefen wurden bislang nicht auf eine Beteiligung von Mch5p am Riboflavintransport untersucht, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass Mch5p hier ebenfalls Riboflavin transportiert.

Obwohl die Mch-Proteine eine Homologie zu menschlichen Monocarboxylattransportern (MCT) aufweisen, konnten Makuc *et al.* (2001) für keines dieser Proteine nachweisen, dass sie am Transport von Monocarboxylaten über die Plasmamembran beteiligt sind. Sie konnten für Mch3p eine Lokalisation in der mitochondriellen Membran zeigen. Es wurde vermutet, dass Mch3p am Import von Pyruvat in die Mitochondrien beteiligt ist, was sich jedoch nicht bestätigen ließ. Somit bleibt die Funktion der anderen Proteine aus der Mchp-Familie weiterhin unbekannt. Wenn man allerdings annimmt, dass die Proteine der Mchp-Familie, ebenso wie die Proteine der Dal5p-Familie, strukturell ähnliche Substrate transportieren, könnte beispielsweise Nicotinamidribosid ein mögliches Substrat für eines der Mch-Proteine sein (siehe Abbildung 4-1). Nicotinamidribosid kommt beispielsweise in Milch vor und verhilft Bäckerhefe in der ein Schritt der Biosynthese von Nicotinsäuredinucleotid (NAD^+) zerstört ist wieder zum Wachstum (Bieganowski und Brenner 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass es über die Plasmamembran aufgenommen werden kann. Bislang ist das für den Import von Nicotinamid verantwortliche Protein nicht bekannt.

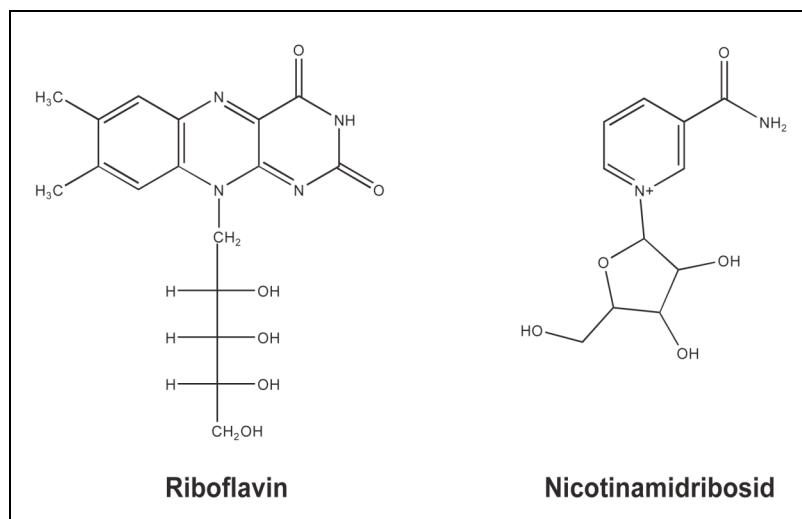


Abb. 4-1: Strukturformeln von Riboflavin und Nicotinamidribosid.

Von den menschlichen Genen der MCT-Familie zeigt MCT8 (auch bekannt als XPCT) die größte Homologie zu *MCH5*. Für dieses Protein wurde beschrieben, dass es den Transport der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4), 3,3',5-Trijodthyronin (T3) und 3,3',5'-Trijodthyronin (rT3) über die Plasmamembran katalysiert (Friesema *et al.* 2003). Es handelt sich bei diesem Transportvorgang um einen Protonensymport, der eine Sättigungskinetik mit unterschiedlichen K_m -Werten (je nach Substrat) im Bereich zwischen 4,7 und 2,2 μM aufweist. Das humane MCT1-Protein katalysiert die Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere von Buttersäure. Auch bei diesem Transporter handelt es sich um einen H⁺-Symporter, der für die Aufnahme von Buttersäure einen K_m -Wert von 3,5 mM hat (Garcia *et al.* 1994). Ein weiteres menschliches Homologe der Mchp-Familie ist MCT2, welches den hochaffinen Transport von Pyruvat vermittelt (Lin *et al.* 1998). Ebenso wie bei MCT1 und MCT8 liegt auch hier ein Protonensymport vor, der einer Sättigungskinetik folgt und einen K_m -Wert von 25 μM aufweist. Neben den hier aufgeführten MCT's gibt es auch noch weitere Proteine aus dieser Familie (MCT3, MCT4, MCT5, MCT6 und MCT7), die alle Monocarboxylate transportieren. Sie zeigen jedoch deutlich geringere Homologien zu den Mch-Proteinen in Bäckerhefe (Makuc *et al.* 2001) und wurden hier deshalb nicht genauer behandelt.

Zusammenfassend kann über die MCTs gesagt werden, dass sie alle negativ geladene Substrate in einem Protonensymportmechanismus transportieren. Dies steht im deutlichen Gegensatz zur Funktion von Mch5p, dessen Substrat ungeladenes Riboflavin ist und seine Aufnahme über erleichterte Diffusion ermöglicht. Der Transport von Pyruvat und Lactat erfolgt in Bäckerhefe über das Jen1p-Transportprotein (Akita *et al.* 2000; Casal *et al.* 1999), welches keinerlei Homologien zu den MCTs und den Mch-Proteinen aufweist.

4.1.3 Besonderheiten der Riboflavinbiosynthesemutanten

Neben der Identifizierung des Riboflavintransporters konnten durch die Arbeit mit *ribΔ*-Mutanten noch weitere interessante Beobachtungen gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *rib4Δ*-Mutante einen deutlich milderden Phänotyp als andere Biosynthesemutanten aufwies. Die Lumazinsynthase Rib4p katalysiert die Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, dem direkten Vorläufer des Riboflavins. Durch *in vitro* Experimente wurde ermittelt, dass diese Reaktion bei Raumtemperatur und in neutraler, wässriger Lösung auch unkatalysiert ablaufen kann (Kis *et al.* 2001). Zwar läuft die unkatalysierte Reaktion deutlich langsamer und mit geringer Regiospezifität ab, jedoch lässt der schwächere Phänotyp der *rib4Δ*-Mutante den Schluss zu, dass diese Reaktion auch *in vivo* unkatalysiert erfolgen kann.

Außerdem konnten unter den *ribΔ*-Mutanten immer wieder Einzelkolonien erhalten werden, die auf niedrigen Riboflavinkonzentrationen wachsen konnten. Das Auftreten solcher Suppressormutanten (*rib**-Mutanten) wurde auch von anderen bereits beschrieben (Boretsky *et al.* 2005; Lesuisse *et al.* 2005). Eine mögliche Erklärung für diese Mutation kann in der Biosynthese von Riboflavin gefunden werden. Die Ausgangssubstrate für die Riboflavinbiosynthese sind GTP und Ribulose-5-Phosphat. In den Zellen kann es durch reaktive Sauerstoffspezies zur Bildung von 8-Oxo-GTP kommen, welches für eine signifikante Menge von spontanen Mutationen verantwortlich gemacht werden kann. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die GTP-Cyclohydrolase II an der Entgiftung von 8-Oxo-GTP beteiligt ist (Kobayashi *et al.* 1998). Vermutlich erfolgt die Entgiftung in *S. cerevisiae* ebenfalls durch dieses Enzym der Biosynthese. Wenn die Biosynthese nicht erfolgen kann besteht die Möglichkeit, dass sich mutagenes 8-Oxo-GTP in den Zellen anreichert und dadurch eine Mutagenisierung zu *rib**-Mutanten erfolgt. Eine Beteiligung der GTP-Cyclohydrolase II an dieser Entgiftung könnte auch ein Grund sein, weshalb keine der bekannten Hefen riboflavauxotroph ist, während Auxotrophien für andere Vitamine der B-Gruppe sehr häufig sind (Koser 1968).

Durch Arbeiten von A. Spitzner und J. Stolz (unveröffentlichte Daten) konnte gezeigt werden, dass der *rib**-Phänotyp in allen der untersuchten Biosynthesemutanten sehr häufig und mit nahezu gleicher Rate auftritt. In der *ribΔ mch5Δ*-Doppelmutante ist dieser Phänotyp jedoch sehr selten aufzufinden. Außerdem treten *rib**-Mutanten nur auf Platten auf, in denen noch Riboflavin vorhanden ist. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass der *rib**-Phänotyp nicht durch einen Umgehungsschritt der Riboflavinbiosynthese, sondern durch

Veränderungen im Mch5p-abhängigen Riboflavintransport bedingt wird. Möglicherweise wird *PUT3* durch 8-Oxo-GTP mutagenisiert, was zu einer Prolin-unabhängigen Induktion der Put3p-Zielgene führen kann (Des Etages *et al.* 2001) und somit zu einer erhöhten Expression von *MCH5*.

4.2 Wahrnehmung von verfügbarem Riboflavin durch *S. cerevisiae*

Im DNA-Microarray war die Expression von *MCH5* in der *rib5Δ*-Mutante dreifach erhöht. Dies führte zur Überlegung, ob die Expressionsänderung nur durch das Fehlen des Riboflavinbiosynthesegens verursacht wird oder ob in den Biosynthesemutanten auch die Riboflavinkonzentration Einfluss auf die Expression von *MCH5* nimmt. Untersuchungen mit *MCH5*prom-lacZ-Konstrukten zeigten, dass die Expression von *MCH5* im *rib5Δ*-Stamm mit sinkender Riboflavinkonzentration steigt. Die Biosynthesemutanten scheinen also in der Lage zu sein, den Riboflavintransporter in Abhängigkeit von verfügbarem Riboflavin zu exprimieren.

Um herauszufinden an welcher Stelle des *MCH5*-Promotors die riboflavinabhängige Regulation stattfindet, wurden *lacZ*-Konstrukte mit verkürzten Promotoren hergestellt. Diese Konstrukte wurden in *rib5Δ*-Zellen transformiert und daraufhin untersucht, bis zu welcher Promotorlänge noch eine riboflavinabhängige Expression zu sehen war. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass diese Regulation im -531 bp bis -398 bp Bereich des *MCH5*-Promotors stattfindet. In diesem Bereich liegt die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Put3p mit dem Motiv CGG (N_{10}) CCG (Siddiqui und Brandriss 1989). Die Rolle von Prolin bei der Riboflavinwahrnehmung wurde daher untersucht.

4.2.1 Regulation des Stickstoffmetabolismus

Zum besseren Verständnis des Modells zur Wahrnehmung von Riboflavin wird hier zunächst auf Regulationen in *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von der Qualität der vorhandenen Stickstoffquellen eingegangen.

4.2.1.1 Allgemeines

Bäckerhefe ist in der Lage, eine Vielzahl von Stickstoffquellen für das Wachstum zu nutzen, jedoch können nicht alle dieser N-Quellen gleich gut verwertet werden. Als gute Stickstoffquellen dienen der Bäckerhefe Ammonium, Glutamin und Asparagin, während Harnstoff und Prolin schlechte Quellen sind. In Hefe erfolgt die Stickstoff-Assimilation prinzipiell über Glutamin und Glutamat (Cooper 1982; Magasanik 1992; Wiame *et al.* 1985).

Glutamat kann direkt aus Ammonium durch die NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase synthetisiert werden (Nagasu und Hall 1985). Diese Umsetzung wird von Gdh1p (im Cytosol) und Gdh3p (in den Mitochondrien) unabhängig katalysiert (DeLuna *et al.* 2001). Die Glutamin-Synthetase Gln1p stellt (im Cytosol) Glutamin aus Ammonium und Glutamat her (Mitchell und Magasanik 1983; Mitchell und Magasanik 1984).

Die Umsetzung von Asparagin in Aspartat und Ammonium erfolgt durch die Asparaginasen Asp1p und Asp3p im Cytosol (Kim *et al.* 1988; Sinclair *et al.* 1994). Harnstoff wird in zwei Schritten zu Ammonium abgebaut. Im ersten Schritt wird Harnstoff zu Allophansäure und diese im zweiten Schritt zu Ammonium und CO₂ umgesetzt. Dieser Abbau wird durch das bifunktionelle und biotinabhängige Enzym Dur1,2p im Cytosol katalysiert (Cooper *et al.* 1980).

Die Degradation von Prolin zu Glutamat erfolgt in drei Schritten in den Mitochondrien (Brandriss und Krzywicki 1986; Cooper 1982; Krzywicki und Brandriss 1984). Zunächst wird Prolin durch die FAD-abhängige Prolinoxidase (Put1p) zu Δ-Pyrroline-5-Carboxylat (P5C) oxidiert (Wang und Brandriss 1987), welches im zweiten Schritt unkatalysiert zu Glutamatsemialdehyd umgesetzt wird. Glutamatsemialdehyd wird dann im letzten Schritt durch die P5C-Dehydrogenase (Put2p) zum verwertbaren Glutamat degradiert (Brandriss 1983).

Wie bereits erwähnt, können nicht alle Stickstoffquellen gleich gut verwertet werden. Aus diesem Grund suchen sich Hefezellen die jeweils beste der verfügbaren Stickstoffquellen über den Mechanismus der Stickstoffkatabolitrepression („nitrogen catabolite repression“, NCR) aus. Der NCR beinhaltet einige Mechanismen zur Wahrnehmung der vorhandenen Stickstoffquellen und reguliert sowohl deren Aufnahme über die Plasmamembran als auch weitere Degradationsgene (Cooper und Sumrada 1983).

Wenn gute Stickstoffquellen zur Verfügung stehen, wird sowohl die Expression der Gene, die für den Import schlechterer Stickstoffquellen benötigt werden als auch der für die Degradation von Harnstoff und Prolin zu Glutamin bzw. Glutamat verantwortlichen Gene, reprimiert (Cooper und Sumrada 1983).

4.2.1.2 Regulation des Prolinmetabolismus

Da das Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin in engem Zusammenhang mit der Verwertung von Prolin steht, wird im Folgenden auf die Regulation der Prolinaufnahme und der Prolinegradation eingegangen.

Die Aufnahme von Prolin über die Plasmamembran erfolgt hauptsächlich über das für Prolin niedrigaffine Transportprotein Gap1p und den hochaffinen Transporter Put4p (Jauniaux und Grenson 1990; Jauniaux *et al.* 1987). Neben den bereits genannten Transportern konnten auch für weitere Proteine die Fähigkeit zum Import von Prolin gezeigt werden. Dabei handelt es sich um die Proteine Agp1p (high-affinity glutamine permease 1) und Gnp1p (glutamine permease 1) die über das Plasmamembran-Wahrnehmungssystem für Aminosäuren (SPS) induziert werden (Andreasson *et al.* 2004). Diese Proteine transportieren Prolin nur mit einer niedrigen Affinität und haben ein breites Substratspektrum.

Während des Wachstums auf Prolin wird diese Aminosäure hauptsächlich durch Gap1p und Put4p aufgenommen. Die Aktivität dieser Transportproteine wird durch ihren Phosphorylierungsstatus reguliert. Sobald für in Prolin angezogene Zellen eine bessere Stickstoffquelle verfügbar ist, werden Gap1p und Put4p durch Dephosphorylierung inaktiviert (Stanbrough und Magasanik 1995), um die Aufnahme der schlechteren Stickstoffquelle zu vermeiden. Die dephosphorylierten Permeasen werden durch die Ubiquitin-Protein-Ligase Npi1p ubiquitiniert, wodurch die Degradation induziert wird (Grenson 1992). Die Transkription der Transportgene Gap1p und Put4p wird in Anwesenheit von Ammonium, Glutamat, Glutamin und Asparagin inhibiert.

Prolin induziert die Expression der Prolinegradationsgene *PUT1* und *PUT2* durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Put3p, wodurch Prolinoxidase und Δ-Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase synthetisiert werden (Brandriss 1983; Brandriss 1987; Wang und Brandriss 1986). Diese Enzyme werden in die Mitochondrien importiert und katalysieren dort die Umsetzung von Prolin in Glutamat (Kaput *et al.* 1989; Krzywicki und Brandriss 1984; Wang und Brandriss 1987).

Der Transkriptionsfaktor Put3p wird sowohl für die Transkription von *PUT1* als auch von *PUT2* benötigt (Brandriss 1987; Marczak und Brandriss 1991). Die Transkription und Translation von *PUT3* erfolgt jedoch unabhängig von den vorhandenen Stickstoffquellen (Marczak und Brandriss 1989). Put3p bindet zudem unabhängig von der Stickstoffquelle an die Put3p-Transkriptionsfaktorbindestellen der Promotoren sowohl von *PUT1* als auch von *PUT2*. Die Transkription der Gene wird allerdings nur in Gegenwart von Prolin und in Abwesenheit einer bevorzugten Stickstoffquelle aktiviert (Axelrod *et al.* 1991; Marczak und

Brandriss 1989; Siddiqui und Brandriss 1988). Die Aktivierung der Transkription der Put3p-regulierten Gene erfolgt durch eine Konformationsänderung, die das bereits an die DNA gebundenen Put3p durch Bindung von Prolin erfährt (Des Etages *et al.* 2001). In Abbildung 4-2 ist die Regulation der Prolindegradation schematisch dargestellt.

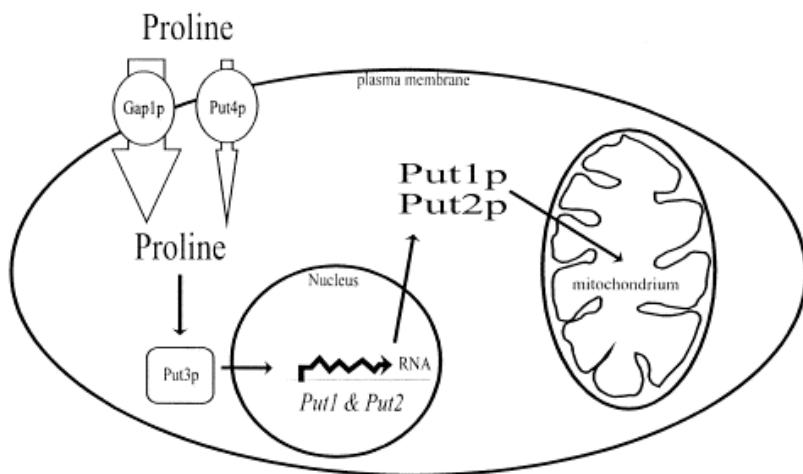


Abb. 4-2: Regulation der Prolindegradation. Intrazelluläres Prolin stimuliert den Transkriptionsfaktor Put3p, wodurch die Synthese der Prolindegradationsproteine Put1p und Put2p aktiviert wird. Diese Proteine werden in die Mitochondrien transportiert und katalysieren dort die Umsetzung von Prolin zu Glutamat. Aus Ter Schure *et al.* (2000) In dieser Abbildung sind die Transportproteine Agp1p und Gnp1p nicht dargestellt.

Der Abbau von Prolin erfolgt in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) über das multifunktionelle Protein PutA. Dieses Protein besitzt sowohl Prolinoxidase- als auch P5C-Dehydrogenaseaktivität (Menzel und Roth 1981). Das multifunktionelle Flavoprotein fungiert einerseits als Repressor der Transkription von *putA* und *putP* (dem Gen das für den Membrantransporter für Prolin kodiert) und andererseits als Enzym des Prolinabbaus. In Abwesenheit von Prolin verbleibt PutA im Cytoplasma, wo es an den Operator des *put*-Operons bindet und die Genexpression verhindert. Wenn PutA Prolin bindet, assoziiert es mit der Plasmamembran, wo es den Abbau von Prolin katalysiert. Die beim Abbau von Prolin frei werdenden Elektronen werden auf FAD übertragen und von dort direkt in die membrangebundene Elektronentransportkette eingespeist. Durch die Bindung von PutA an die Plasmamembran sinkt sein Anteil im Cytoplasma, wodurch die Bindestellen am Operator des *put*-Operons frei werden und somit die Expression dieser Gene ermöglicht wird (Ostrovsky de Spicer und Maloy 1993). Von Surber und Maloy (1999) wurde beschrieben, dass die Bindung von PutA an die Membran durch eine Konformationsänderung bedingt wird. Diese erfolgt durch reduziertes kovalent gebundenes FAD. Durch die Reduktion von FAD wird die Hydrophobizität von PutA erhöht, wodurch es an die Membran gebunden werden kann.

4.2.2 Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin in *S. cerevisiae*

Wie bereits erwähnt, konnte im Bereich des *MCH5*-Promotors in dem die Regulation in Abhängigkeit von der Riboflavinkonzentration stattfindet, eine Bindestelle für den Put3p-Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob die riboflavinabhängige Regulation des *MCH5*-Promotors durch eine Bindung von Put3p vermittelt wird, wurde die β-Galaktosidaseaktivität des *MCH5*prom-lacZ-Konstrukts in WT-, *rib5Δ*-, *put3Δ*- und *rib5Δ put3Δ*-Zellen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass in den *rib5Δ put3Δ*-Zellen keine signifikante Expressionserhöhung bei niedriger Riboflavinkonzentration erfolgte (siehe Abbildung 3-21). Neben der Untersuchung der Promotoraktivität wurde das Wachstum der Zellen bei unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen getestet. So konnte nachgewiesen werden, dass die *rib5Δ put3Δ*-Mutante den gleichen Phänotyp aufwies wie die *rib5Δ mch5Δ*-Mutante (siehe Abbildung 3-22). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in *put3Δ*-Mutanten die Expression von *MCH5* unterbleibt.

Da für die Expressionsaktivierung von *PUT1* und *PUT2* durch Put3p intrazellulär vorhandenes Prolin notwendig ist (Axelrod *et al.* 1991), wurde der Einfluss von Prolin auf die Expression von *MCH5* untersucht. Sowohl durch Reportertests mit dem *MCH5*-Promotor als auch durch Wachstumstests der Zellen auf Medien mit Prolin als Stickstoffquelle und unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MCH5* durch Prolin stark induziert wird (siehe Abbildungen 3-23 und 3-24). In Zellen, in denen der Transkriptionsfaktor Put3p durch eine Mutation auch in Abwesenheit von Prolin, also konstitutiv aktiv ist (Des Etages *et al.* 2001), konnte ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression von *MCH5* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-25).

Um sicherzustellen, dass es sich bei der im *MCH5*-Promotor identifizierten Transkriptionsfaktorbindestelle tatsächlich um die Stelle handelt an der die Expression induziert wird, wurde diese Bindestelle ersetzt und die Expression von *lacZ* unter Kontrolle dieses Promotors in unterschiedlichen Stämmen und Medien untersucht. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass im modifizierten *MCH5*-Promotor die Expression von *MCH5* weder durch niedrige Riboflavinkonzentrationen noch durch Prolin induzierbar war. Diese Ergebnisse führten zur Schlussfolgerung, dass es sich bei der identifizierten Put3p-Transkriptionsfaktorbindestelle um die regulatorische Einheit für die Riboflavinwahrnehmung handelt.

Da die Aktivierung von *PUT1*, *PUT2* und *MCH5* durch Put3p erfolgt, führt eine intrazelluläre Akkumulation von Prolin zur Expression dieser Gene. Bei der Prolineoxidase Put1p handelt es sich um ein Enzym, welches FAD (aus Riboflavin synthetisiert) als Cofaktor benötigt (Wang und Brandriss 1987). Diese Tatsachen führten zum in Abbildung 4-3 dargestellten Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin in *S. cerevisiae*.

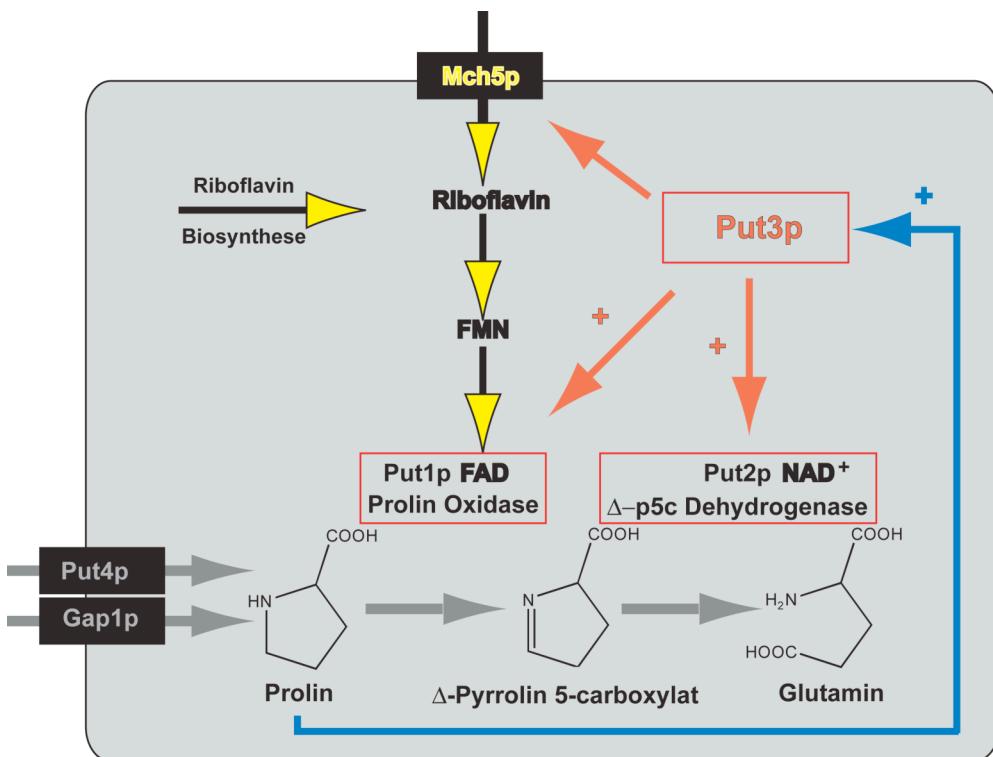


Abb. 4-3: Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin in *S. cerevisiae*. Durch niedrige Riboflavin-konzentrationen liegt nicht genügend FAD zur Sättigung der Prolinoxidase Put1p mit dem Cofaktor vor. Dies führt zu einer Akkumulation von Prolin, welches den Transkriptionsfaktor Put3p stimuliert und wodurch wiederum die Synthese von Put1p und Put2p sowie des Riboflavintransporters Mch5p aktiviert wird. In dieser Abbildung sind nur Zwischenprodukte und Transportproteine, die für das Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin relevant sind, dargestellt.

FAD wird aus Riboflavin synthetisiert, deshalb führt ein intrazellulärer Riboflavinmangel ebenfalls zu einer niedrigen intrazellulären FAD-Konzentration. Das Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin beruht auf der Vermutung, dass die Prolinoxidase Put1p eine niedrige Affinität zu FAD hat. Die enzymatische Aktivität von Put1p erfordert jedoch die Bindung von FAD als Cofaktor. Wenn in der Zelle die Konzentration an FAD abnimmt und Put1p nur eine niedrige Affinität zu FAD hat, würde eine Verarmung an FAD dazu führen, dass die Aktivität der Prolinoxidase abnimmt und es somit zu einer intrazellulären Anreicherung von Prolin kommt.

Durch intrazellulär vorhandenes Prolin wird die Transkription der Put3p regulierten Gene induziert (des Etages *et al.* 1996), wodurch die Prolin-Degradationsgene *PUT1* und *PUT2* sowie das den Riboflavintransporter kodierende Gen *MCH5* exprimiert werden. Es wird demnach vermutet, dass die FAD-abhängige Prolinoxidase-Aktivität für die Wahrnehmung von intrazellulärem FAD verantwortlich ist. Wenn der Zelle nicht mehr genügend FAD zur Verfügung steht, wird nach diesem Modell zuerst die Prolinoxidase nicht mehr ausreichend mit dem Cofaktor versorgt, wodurch es zu einer Verminderung ihrer Aktivität kommt. Eine zu

geringe Aktivität der Prolinoxidase führt zu einer Akkumulation von Prolin, welches wiederum die Induktion der Put3p-abhängigen Transkription der Zielgene zur Folge hat. Um den möglichen FAD-Mangel auszugleichen, der zur Anreicherung von Prolin führen kann, werden mehr Transportproteine für Riboflavin gebildet, um wiederum mehr Riboflavin zur Synthese von FAD aufnehmen zu können.

Nach diesem Modell müsste nicht nur der Riboflavinmangel in einer *ribΔ*-Mutante zu einer Expressionserhöhung von *MCH5* führen, sondern auch ein anders bedingter FAD-Mangel. Bei *FAD1* handelt es sich um ein essentielles Gen, weil FAD nicht in ausreichender Menge aus dem Medium aufgenommen werden kann (Wu *et al.* 1995). Da für *FAD1* keine Deletionsmutante hergestellt werden kann, wurde dieses Gen genomisch unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gestellt. Dies führt dazu, dass auf Glucosemedium die Expression des Gens reprimiert wird und es somit zu einem FAD-Mangel in der Zelle kommt. In den Experimenten die dieser Arbeit zugrunde liegen konnte mit dem *MCH5*prom-lacZ-Konstrukt keine Expressionserhöhung durch FAD-Mangel gezeigt werden. Durch Arbeiten von A. Spitzner und J. Stolz (unveröffentliche Daten) konnte jedoch durch Modifikationen der Anzuchtbedingungen und des β-Galactosidaseaktivitätstests nachgewiesen werden, dass diese Zellen, nachdem sie für 36 Stunden auf Glucosemedium inkubiert wurden, *MCH5-lacZ* doppelt so stark exprimieren wie der Wildtyp.

Genauso wie ein Aktivitätsverlust von Put1p durch FAD-Mangel erfolgt, müsste es in *put1Δ*-Mutanten zu einer Akkumulation von Prolin und der daraus resultierenden Expressionserhöhung von *MCH5* kommen. Aus diesem Grund wurde die Expression von *MCH5* in *put1Δ*- und *put2Δ*-Mutanten mit dem *MCH5*prom-lacZ-Konstrukt in Medien mit aufsteigenden Prolinkonzentrationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MCH5* in den *put1Δ*-Mutanten, verglichen zum Wildtyp, im Schnitt um den Faktor 1,8 erhöht war (siehe Abbildung 3-27). In den *put2Δ*-Mutanten war die Expression von *MCH5* im Schnitt sogar um den Faktor 2,5 erhöht (siehe Abbildung 3-27). Gegebenenfalls kann dies dadurch erklärt werden, dass Glutamatsemialdehyd die Transkription durch Put3p stärker induziert. Von Sellick und Reece (2003) wurde bereits gezeigt, dass auch andere Substrate, wie Pyrrolidin, die Transkription durch Put3p induzieren. Der Einfluss von Glutamatsemialdehyd auf die Aktivität von Put3p wurde dabei nicht untersucht, es besteht aber die Möglichkeit, dass dies ebenfalls aktivierend wirkt.

Im Modell zur Wahrnehmung von Riboflavin wird vermutet, dass Put1p eine geringe Affinität zu FAD hat und somit FAD für die Prolinoxidase erst zur Verfügung steht, wenn andere FAD-tragende Enzyme abgesättigt sind. Aus diesem Grund sollte der K_m -Werts mit dem FAD

an Put1p bindet ermittelt werden. Dazu wurde Put1p in einem *E. coli*-Stamm heterolog exprimiert und dessen Prolinoxidase-Aktivität untersucht. Dieser Versuch zeigte, dass das heterolog exprimierte Put1p Prolin zu P5C oxidieren kann. Durch Zugabe von FAD wurde allerdings keine Steigerung der Aktivität festgestellt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Prolinoxidase nicht als Apoprotein sondern bereits in seiner aktiven Form (mit FAD als Cofaktor) vorlag. Um den K_m -Wert für die Affinität von Put1p zu FAD bestimmen zu können, müsste Put1p in Form seines Apoproteins vorliegen. Dies kann möglicherweise mittels Dialyse oder durch die Expression von *PUT1* in einem Riboflavinbiosynthese-defizienten Stamm erreicht werden. Diese Untersuchung soll in weiteren Arbeiten durchgeführt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass Put1p nicht nur für den Abbau von Prolin sondern zusätzlich für die Wahrnehmung des intrazellulär verfügbaren Riboflavins zuständig ist. Für PutA aus *E. coli* und *S. thyphimurium* wurde ebenfalls gezeigt, dass dessen Expression und Aktivität im engen Zusammenhang mit FAD steht (Zhang *et al.* 2004).

Das Modell, das zur Wahrnehmung von Riboflavin erstellt wurde, unterscheidet sich deutlich von den Mechanismen zur Wahrnehmung von Glucose, Phosphat und Thiamin. Bei Glucose und Phosphat wird jeweils direkt die Menge des verfügbaren Substrates festgestellt, während Thiamin in Form seines Cofaktors ThDP wahrgenommen wird.

In *B. subtilis* und *L. lactis* erfolgt die Wahrnehmung von Riboflavin und die Regulation des Riboflavintransporters und der Riboflavinbiosynthesegene über das RFN-Element, durch Bindung von freiem FMN (Vitreschak *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu scheint in *S. cerevisiae* lediglich die Regulation des Transporters durch den postulierten Mechanismus über Put3p zu erfolgen. Im DNA-Microarray konnte jedoch neben der Expressionserhöhung des Riboflavin-transporters ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression der Riboflavinbiosynthesegene und der Gene von FAD-abhängigen Proteinen in einer *rib5Δ*-Mutante hochreguliert ist. Diese Regulation kann jedoch nicht über Put3p erfolgen, da in den Promotoren dieser Gene (außer im *PUT1*-Promotor) keine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Put3p vorhanden ist. Die Expression dieser Gene in Abhängigkeit von verfügbarem Flavin muss folglich über einen noch unbekannten Mechanismus erfolgen.

5 Zusammenfassung

Riboflavin ist ein wasserlösliches Vitamin der B-Gruppe und wird für die Biosynthese der Cofaktoren FMN und FAD benötigt. Höhere Eukaryonten (mit Ausnahme von Pflanzen) können Riboflavin nicht selbst synthetisieren und müssen es somit durch Transportproteine aus der Nahrung aufnehmen. Es konnte für einige Eukaryonten bereits Riboflavinaufnahme gezeigt werden, jedoch war bislang von keinem Transportprotein die Sequenz bekannt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein genetischer Ansatz, bei dem Zellen mit einem deletierten Riboflavinbiosynthesegen (*ribΔ*-Mutanten) mit einer Multicopy-Genbank komplementiert wurden, zur Ermittlung eines Riboflavintransporters verwendet. Dies führte zur Identifizierung von *MCH5* aus *S. cerevisiae*, welches Homologien zu menschlichen Monocarboxylattransportproteinen besitzt und den Plasmamembrantransporter für Riboflavin kodiert. Zunächst konnte durch Wachstumstests in *ribΔ*-Mutanten nachgewiesen werden, dass eine Überexpression bzw. Deletion von *MCH5* den Riboflavinbedarf der untersuchten Zellen deutlich verändert hat. Anschließend konnte sowohl in *MCH5*-überexprimierenden *S. cerevisiae rib4Δ*-Zellen als auch in *MCH5* heterolog exprimierenden *S. pombe*-Zellen gezeigt werden, dass es sich bei Mch5p um einen hochaffinen Transporter ($K_m = 17 \pm 6 \mu\text{M}$) mit einem pH-Optimum von 7,5 handelt. Der Transportvorgang wird durch Protonophoren nicht inhibiert und durch Zugabe von Glucose oder Ethanol nicht stimuliert. Dies deutet darauf hin, dass Mch5p ein Uniporter ist. Die verbliebenen Proteine der Mchp-Familie scheinen nicht am Transport von Riboflavin beteiligt zu sein.

Die Expression von *MCH5* wird in einer *rib5Δ*-Mutante mit abnehmender Riboflavin-konzentration gesteigert. Die untersuchten Zellen sind in der Lage Riboflavinkonzentrationen wahrzunehmen sowie einem Mangel durch eine höhere Expression von *MCH5* entgegenzuwirken. Die Analyse von Fragmenten des *MCH5*-Promotors ergab, dass die riboflavin-abhängige Expression im Bereich -531 bp bis -398 bp des Promotors stattfindet. In diesem Bereich liegt eine Bindestelle für Put3p, an welcher die riboflavinabhängige Expression von *MCH5* durch den Transkriptionsfaktor Put3p erfolgt. Put3p induziert in Anwesenheit von Prolin die Transkription der Gene zur Degradation von Prolin zu Glutamat und *MCH5*. Bei den Proteinen, die für die Verwertung von Prolin als Stickstoffquelle benötigt werden, handelt es sich um die Prolinoxidase Put1p und die P5C-Dehydrogenase Put2p. Put1p trägt in seiner aktiven Form FAD- das aus Riboflavin synthetisiert wird- als Cofaktor. Diese Fakten führen zur Erstellung eines Modells zur Wahrnehmung von Riboflavin. In diesem Modell führt die Anhäufung von Prolin, durch eine geringere Aktivität von Put1p, zur Transkriptionsaktivierung durch Put3p und dadurch zur Expression von *MCH5*.

6 Literatur

- Ahmad, M. and A. R. Cashmore (1993). "HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor." *Nature* 366(6451): 162-6.
- Akita, O., C. Nishimori, T. Shimamoto, T. Fujii and H. Iefuji (2000). "Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease." *Biosci Biotechnol Biochem* 64(5): 980-4.
- Andreasson, C., E. P. Neve and P. O. Ljungdahl (2004). "Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast." *Yeast* 21(3): 193-9.
- Auesukaree, C., T. Homma, H. Tochio, M. Shirakawa, Y. Kaneko and S. Harashima (2004). "Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 279(17): 17289-94.
- Axelrod, J. D., J. Majors and M. C. Brandriss (1991). "Proline-independent binding of PUT3 transcriptional activator protein detected by footprinting in vivo." *Mol Cell Biol* 11(1): 564-7.
- Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippse and J. R. Pringle (1998). "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* 14(10): 943-51.
- Bender, D. A. (2003) Nutritional Biochemistry of the Vitamins, 512 pp. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bieganowski, P. and C. Brenner (2004). "Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans." *Cell* 117(4): 495-502.
- Bisson, L. F. (1988). "High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control." *J Bacteriol* 170(10): 4838-45.
- Bisson, L. F., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg and D. A. Lewis (1993). "Yeast sugar transporters." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28(4): 259-308.
- Bisson, L. F., L. Neigeborn, M. Carlson and D. G. Fraenkel (1987). "The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 169(4): 1656-62.
- Bleeg, H. S. and F. Christensen (1982). "Biosynthesis of ascorbate in yeast. Purification of L-galactono-1,4-lactone oxidase with properties different from mammalian L-gulonolactone oxidase." *Eur J Biochem* 127(2): 391-6.
- Blyth, A. (1879). "The composition of cows' milk in health and disease." *J. Chem. Soc*(35): 530-539.
- Boles, E. and C. P. Hollenberg (1997). "The molecular genetics of hexose transport in yeasts." *FEMS Microbiol Rev* 21(1): 85-111.

- Bomer, U., M. Meijer, A. C. Maarse, A. Honlinger, P. J. Dekker, N. Pfanner and J. Rassow (1997). "Multiple interactions of components mediating preprotein translocation across the inner mitochondrial membrane." *Embo J* 16(9): 2205-16.
- Bonen, A., M. Heynen and H. Hatta (2006). "Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* 31(1): 31-9.
- Boretsky, Y. R., K. Y. Kapustyak, L. R. Fayura, O. V. Stasyk, M. M. Stenchuk, Y. P. Bobak, L. B. Drobot and A. A. Sibirny (2005). "Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*." *FEMS Yeast Res* 5(9): 829-37.
- Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter and J. D. Boeke (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." *Yeast* 14(2): 115-32.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brandriss, M. C. (1983). "Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT2 gene." *Mol Cell Biol* 3(10): 1846-56.
- Brandriss, M. C. (1987). "Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 117(3): 429-35.
- Brandriss, M. C. and K. A. Krzywicki (1986). "Amino-terminal fragments of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 6(10): 3502-12.
- Brandriss, M. C. and B. Magasanik (1979). "Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline." *J Bacteriol* 140(2): 498-503.
- Brandriss, M. C. and B. Magasanik (1979). "Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation causing constitutive enzyme expression." *J Bacteriol* 140(2): 504-7.
- Bretzel, W., W. Schurter, B. Ludwig, E. Kupfer, S. Doswald, M. Pfister and A. van Loon (1999). "Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: downstream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22: 19-26.
- Bun-Ya, M., M. Nishimura, S. Harashima and Y. Oshima (1991). "The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter." *Mol Cell Biol* 11(6): 3229-38.
- Burgess, C. M., D. J. Slotboom, E. R. Geertsma, R. H. Duurkens, B. Poolman and D. van Sinderen (2006). "The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism." *J Bacteriol* 188(8): 2752-60.

- Bässler, K., I. Golly, D. Loew and K. Pietrzik (2002) Vitamin-Lexikon, pp. Urban & Fischer, München-Jena.
- Carlberg, I. and B. Mannervik (1975). "Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver." *J Biol Chem* 250(14): 5475-80.
- Casal, M., S. Paiva, R. P. Andrade, C. Gancedo and C. Leao (1999). "The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1." *J Bacteriol* 181(8): 2620-3.
- Cecchini, G., M. Perl, J. Lipsick, T. P. Singer and E. B. Kearney (1979). "Transport and binding of riboflavin by *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem* 254(15): 7295-301.
- Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Sherod and P. Hieter (1992). "Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors." *Gene* 110(1): 119-22.
- Cliften, P., P. Sudarsanam, A. Desikan, L. Fulton, B. Fulton, J. Majors, R. Waterston, B. A. Cohen and M. Johnston (2003). "Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting." *Science* 301(5629): 71-6.
- Cooper, T. G. (1982) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, 39-99 pp. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Cooper, T. G., C. Lam and V. Turoscy (1980). "Structural analysis of the dur loci in *S. cerevisiae*: two domains of a single multifunctional gene." *Genetics* 94(3): 555-80.
- Cooper, T. G. and R. A. Sumrada (1983). "What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?" *J Bacteriol* 155(2): 623-7.
- D'Aniello, A., G. D'Onofrio, M. Pischedola, G. D'Aniello, A. Vetere, L. Petruccielli and G. H. Fisher (1993). "Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids." *J Biol Chem* 268(36): 26941-9.
- Daran-Lapujade, P., J. M. Daran, P. Kotter, T. Petit, M. D. Piper and J. T. Pronk (2003). "Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays." *FEMS Yeast Res* 4(3): 259-69.
- DeLuna, A., A. Avendano, L. Riego and A. Gonzalez (2001). "NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles." *J Biol Chem* 276(47): 43775-83.
- des Etages, S. A., D. A. Falvey, R. J. Reece and M. C. Brandriss (1996). "Functional analysis of the PUT3 transcriptional activator of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 142(4): 1069-82.
- Des Etages, S. A., D. Saxena, H. L. Huang, D. A. Falvey, D. Barber and M. C. Brandriss (2001). "Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* 40(4): 890-9.
- DGE (2001) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 240 pp. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.

- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." *Gene* 67(1): 21-30.
- Eberhardt, S., G. Richter, W. Gimbel, T. Werner and A. Bacher (1996). "Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 242(3): 712-9.
- el Moualij, B., C. Duyckaerts, J. Lamotte-Brasseur and F. E. Sluse (1997). "Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 13(6): 573-81.
- Emmett, A. and L. McKim (1917). "The value of the yeast vitamine fraction as a supplement to a rice diet." *J Biol Chem* 32(3): 409-419.
- Enjo, F., K. Nosaka, M. Ogata, A. Iwashima and H. Nishimura (1997). "Isolation and characterization of a thiamin transport gene, THI10, from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 272(31): 19165-70.
- Fischer, M. and A. Bacher (2005). "Biosynthesis of flavocoenzymes." *Nat Prod Rep* 22(3): 324-50.
- Forsburg, S. L. (1993). "Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems." *Nucleic Acids Res* 21(12): 2955-6.
- Fraaije, M. W. and A. Mattevi (2000). "Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features." *Trends Biochem Sci* 25(3): 126-32.
- Frandsen, A. R. and C. A. Kaiser (1998). "The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum." *Mol Cell* 1(2): 161-70.
- Friesema, E. C., S. Ganguly, A. Abdalla, J. E. Manning Fox, A. P. Halestrap and T. J. Visser (2003). "Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter." *J Biol Chem* 278(41): 40128-35.
- Funabiki, H., K. Kumada and M. Yanagida (1996). "Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes." *Embo J* 15(23): 6617-28.
- Förster, C., J. L. Revuelta and R. Krämer (2001). "Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii*." *Appl Microbiol Biotechnol* 55(1): 85-9.
- Garcia, C. K., J. L. Goldstein, R. K. Pathak, R. G. Anderson and M. S. Brown (1994). "Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle." *Cell* 76(5): 865-73.
- Garcia-Ramirez, J. J., M. A. Santos and J. L. Revuelta (1995). "The *Saccharomyces cerevisiae* RIB4 gene codes for 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase involved in riboflavin biosynthesis. Molecular characterization of the gene and purification of the encoded protein." *J Biol Chem* 270(40): 23801-7.

- Gastaldi, G., G. Ferrari, A. Verri, D. Casirola, M. N. Orsenigo and U. Laforenza (2000). "Riboflavin phosphorylation is the crucial event in riboflavin transport by isolated rat enterocytes." *J Nutr* 130(10): 2556-61.
- Gelfand, M. S., A. A. Mironov, J. Jomantas, Y. I. Kozlov and D. A. Perumov (1999). "A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes." *Trends Genet* 15(11): 439-42.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods and R. H. Schiestl (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." *Nucleic Acids Res* 20(6): 1425.
- Gietz, R. D. and A. Sugino (1988). "New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites." *Gene* 74(2): 527-34.
- Grenson, M. (1983). "Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* 133(1): 135-9.
- Grenson, M. (1992) Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation, 219-245 pp. Elsevier Science, Amsterdam.
- György, P., R. Kuhn and T. Wagner-Jauregg (1933). "Über das Vitamin B2." *Journal of Molecular Medicine* 12(32): 1241-1245.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-80.
- Harbison, C. T., D. B. Gordon, T. I. Lee, N. J. Rinaldi, K. D. Macisaac, T. W. Danford, N. M. Hannett, J. B. Tagne, D. B. Reynolds, J. Yoo, E. G. Jennings, J. Zeitlinger, D. K. Pokholok, M. Kellis, P. A. Rolfe, K. T. Takusagawa, E. S. Lander, D. K. Gifford, E. Fraenkel and R. A. Young (2004). "Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome." *Nature* 431(7004): 99-104.
- Henderson, P. J. (1993). "The 12-transmembrane helix transporters." *Curr Opin Cell Biol* 5(4): 708-21.
- Hermida, L., S. Brachat, S. Voegeli, P. Philippsen and M. Primig (2005). "The Ashbya Genome Database (AGD)--a tool for the yeast community and genome biologists." *Nucleic Acids Res* 33(Database issue): D348-52.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner and A. Tzagoloff (1986). "Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites." *Yeast* 2(3): 163-7.
- Hiroshi, N., T. Takeshi and H. Masahiko (1986). "Method of producing solution containing D-ribose." US patent 4,602,086.
- Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli." *Gene* 57(2-3): 267-72.

- Hohmann, S. and P. A. Meacock (1998). "Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation." *Biochim Biophys Acta* 1385(2): 201-19.
- Holmes, D. S. and M. Quigley (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." *Anal Biochem* 114(1): 193-7.
- Huang, H. L. and M. C. Brandriss (2000). "The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source." *Mol Cell Biol* 20(3): 892-9.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-8.
- Iwashima, A., Y. Wakabayashi and Y. Nose (1975). "Thiamine transport mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 413(2): 243-7.
- Jauniaux, J. C. and M. Grenson (1990). "GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression." *Eur J Biochem* 190(1): 39-44.
- Jauniaux, J. C., M. Vandenbol, S. Vissers, K. Broman and M. Grenson (1987). "Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains." *Eur J Biochem* 164(3): 601-6.
- Jin, C., A. Barrientos and A. Tzagoloff (2003). "Yeast dihydroxybutanone phosphate synthase, an enzyme of the riboflavin biosynthetic pathway, has a second unrelated function in expression of mitochondrial respiration." *J Biol Chem* 278(17): 14698-703.
- Kagawa, T. (2003). "The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation." *J Plant Res* 116(1): 77-82.
- Kaput, J., M. C. Brandriss and T. Prussak-Wieckowska (1989). "In vitro import of cytochrome c peroxidase into the intermembrane space: release of the processed form by intact mitochondria." *J Cell Biol* 109(1): 101-12.
- Karrer, P., K. Schöpp, F. Benz and K. Pfaehler (1935). "Synthesen von Flavinen III." *Helvetica Chimica Acta* 18(1): 69-79.
- Karthikeyan, S., Q. Zhou, F. Mseeh, N. V. Grishin, A. L. Osterman and H. Zhang (2003). "Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a beta barrel fold and a novel active site arch." *Structure* 11(3): 265-73.
- Kawasaki, Y., K. Nosaka, Y. Kaneko, H. Nishimura and A. Iwashima (1990). "Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 172(10): 6145-7.
- Kellis, M., N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren and E. S. Lander (2003). "Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements." *Nature* 423(6937): 241-54.

- Kim, K. W., J. Q. Kamerud, D. M. Livingston and R. J. Roon (1988). "Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene." *J Biol Chem* 263(24): 11948-53.
- Kis, K., K. Kugelbrey and A. Bacher (2001). "Biosynthesis of riboflavin. The reaction catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase can proceed without enzymatic catalysis under physiological conditions." *J Org Chem* 66(8): 2555-9.
- Kishimoto, K., K. Kiotaka and N. Uchiyama (1990). "Production of D-ribose." US patent 4,904,587.
- Klebl, F., M. Zillig and N. Sauer (2000). "Transcription of the yeast TNA1 gene is not only regulated by nicotinate but also by p-aminobenzoate." *FEBS Lett* 481(1): 86-7.
- Knauer, R. and L. Lehle (1999). "The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex." *J Biol Chem* 274(24): 17249-56.
- Kobayashi, M., Y. Ohara-Nemoto, M. Kaneko, H. Hayakawa, M. Sekiguchi and K. Yamamoto (1998). "Potential of *Escherichia coli* GTP cyclohydrolase II for hydrolyzing 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis." *J Biol Chem* 273(41): 26394-9.
- Koser, A. (1968) Vitamin Requirements of Bacteria and Yeasts, 663 pp. Thomas C, Springfield, Illinois, USA.
- Kreneva, R. A., M. S. Gel'fand, A. A. Mironov, A. Iomantas Iu, I. Kozlov Iu, A. S. Mironov and D. A. Perumov (2000). "Inactivation of the ypaA gene in *Bacillus subtilis*; Analysis of the Resulting Phenotypic Expression." *Genetika* 36(8): 1166-8.
- Kruckeberg, A. L. (1996). "The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Microbiol* 166(5): 283-92.
- Krzywicki, K. A. and M. C. Brandriss (1984). "Primary structure of the nuclear PUT2 gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 4(12): 2837-42.
- Kuhn, R., K. Reinemund, F. Weygand and R. Ströbele (1935). "Über die Synthese des Lactoflavins." *Ber. Deutsch. Chem. Gesells*(68): 1765-1774.
- Kurth, R., J. Paust and w. Hähnlein (2005) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, pp. Wiley-VCH Verlag GmbH & co. KGaA, Weinheim.
- Laage, R. and C. Ungermann (2001). "The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion." *Mol Biol Cell* 12(11): 3375-85.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lago, B. and L. Kaplan (1981). "Vitamin fermentations: B2 and B12." *Adv Biotechnol*(3): 241-246.

- Lange, H., T. Lisowsky, J. Gerber, U. Muhlenhoff, G. Kispal and R. Lill (2001). "An essential function of the mitochondrial sulphydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins." *EMBO Rep* 2(8): 715-20.
- Lasko, P. F. and M. C. Brandriss (1981). "Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 148(1): 241-7.
- Lee, T. I., N. J. Rinaldi, F. Robert, D. T. Odom, Z. Bar-Joseph, G. K. Gerber, N. M. Hannett, C. T. Harbison, C. M. Thompson, I. Simon, J. Zeitlinger, E. G. Jennings, H. L. Murray, D. B. Gordon, B. Ren, J. J. Wyrick, J. B. Tagne, T. L. Volkert, E. Fraenkel, D. K. Gifford and R. A. Young (2002). "Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* 298(5594): 799-804.
- Lesuisse, E., S. A. Knight, M. Courel, R. Santos, J. M. Camadro and A. Dancis (2005). "Genome-wide screen for genes with effects on distinct iron uptake activities in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 169(1): 107-22.
- Li, F. N. and M. Johnston (1997). "Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle." *Embo J* 16(18): 5629-38.
- Liang, D. T., J. A. Hodson and S. L. Forsburg (1999). "Reduced dosage of a single fission yeast MCM protein causes genetic instability and S phase delay." *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 559-67.
- Lin, R. Y., J. C. Vera, R. S. Chaganti and D. W. Golde (1998). "Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter." *J Biol Chem* 273(44): 28959-65.
- Llorente, B. and B. Dujon (2000). "Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DAL5 gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease TNA1 (YGR260w)." *FEBS Lett* 475(3): 237-41.
- Loubbardi, A., C. Marcireau, F. Karst and M. Guilloton (1995). "Sterol uptake induced by an impairment of pyridoxal phosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and sequencing of the PDX3 gene encoding pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase." *J Bacteriol* 177(7): 1817-23.
- Mack, M., A. P. van Loon and H. P. Hohmann (1998). "Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC." *J Bacteriol* 180(4): 950-5.
- Magasanik, B. (1992) Regulation of nitrogen utilization, 283-317 pp. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Makuc, J., S. Paiva, M. Schauen, R. Kramer, B. Andre, M. Casal, C. Leao and E. Boles (2001). "The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane." *Yeast* 18(12): 1131-43.
- Marcireau, C., J. Joets, D. Poussset, M. Guilloton and F. Karst (1996). "FEN2: a gene implicated in the catabolite repression-mediated regulation of ergosterol biosynthesis in yeast." *Yeast* 12(6): 531-9.

- Marczak, J. E. and M. C. Brandriss (1989). "Isolation of constitutive mutations affecting the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular analysis of the PUT3 transcriptional activator." *Mol Cell Biol* 9(11): 4696-705.
- Marczak, J. E. and M. C. Brandriss (1991). "Analysis of constitutive and noninducible mutations of the PUT3 transcriptional activator." *Mol Cell Biol* 11(5): 2609-19.
- Marger, M. D. and M. H. Saier, Jr. (1993). "A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport." *Trends Biochem Sci* 18(1): 13-20.
- McCormick, D. B. (1989). "Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine." *Physiol Rev* 69(4): 1170-98.
- Meighen, E. A. (1993). "Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes." *Faseb J* 7(11): 1016-22.
- Menzel, R. and J. Roth (1981). "Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate." *J Biol Chem* 256(18): 9755-61.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics, 352-355 pp. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Mitchell, A. P. and B. Magasanik (1983). "Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 258(1): 119-24.
- Mitchell, A. P. and B. Magasanik (1984). "Biochemical and physiological aspects of glutamine synthetase inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 259(19): 12054-62.
- Mortl, S., M. Fischer, G. Richter, J. Tack, S. Weinkauf and A. Bacher (1996). "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 271(52): 33201-7.
- Mouillon, J. M. and B. L. Persson (2006). "New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res* 6(2): 171-6.
- Moynihan, E. B. and T. Enoch (1999). "Liz1p, a novel fission yeast membrane protein, is required for normal cell division when ribonucleotide reductase is inhibited." *Mol Biol Cell* 10(2): 245-57.
- Mumberg, D., R. Muller and M. Funk (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* 156(1): 119-22.
- Nagasu, T. and B. D. Hall (1985). "Nucleotide sequence of the GDH gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 37(1-3): 247-53.
- Niederberger, C., H. Fankhauser, E. Edenthaler and M. E. Schweingruber (1996). "Amiloride toxicity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is released by thiamine and mutations in the thiamine-repressible gene car1." *Gene* 171(1): 119-22.

- Nishimura, H., Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka and A. Iwashima (1992). "Cloning and characteristics of a positive regulatory gene, THI2 (PHO6), of thiamin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett 297(1-2): 155-8.
- Nishimura, H., Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka and A. Iwashima (1992). "A positive regulatory gene, THI3, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol 174(14): 4701-6.
- Nosaka, K., Y. Kaneko, H. Nishimura and A. Iwashima (1993). "Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 268(23): 17440-7.
- Nosaka, K., H. Nishimura, Y. Kawasaki, T. Tsujihara and A. Iwashima (1994). "Isolation and characterization of the THI6 gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 269(48): 30510-6.
- Nosaka, K., M. Onozuka, H. Konno, Y. Kawasaki, H. Nishimura, M. Sano and K. Akaji (2005). "Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol 58(2): 467-79.
- Okajima, K., S. Yoshihara, Y. Fukushima, X. Geng, M. Katayama, S. Higashi, M. Watanabe, S. Sato, S. Tabata, Y. Shibata, S. Itoh and M. Ikeuchi (2005). "Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria." J Biochem (Tokyo) 137(6): 741-50.
- Oltmanns, O. and A. Bacher (1972). "Biosynthesis of riboflavin in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of genes rib 1 and rib 7." J Bacteriol 110(3): 818-22.
- Opekarova, M., I. Robl and W. Tanner (2002). "Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast." Biochim Biophys Acta 1564(1): 9-13.
- Osborne, T. and L. Mendel (1913). "The relation of growth to the chemical constituents of the diet." J. Biol. Chem.(15): 311 - 326.
- Ostrovska de Spicer, P. and S. Maloy (1993). "PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator." Proc Natl Acad Sci U S A 90(9): 4295-8.
- Ozcan, S., J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wolf and M. Johnston (1996). "Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A 93(22): 12428-32.
- Ozcan, S. and M. Johnston (1995). "Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose." Mol Cell Biol 15(3): 1564-72.
- Ozcan, S. and M. Johnston (1999). "Function and regulation of yeast hexose transporters." Microbiol Mol Biol Rev 63(3): 554-69.

- Ozcan, S., T. Leong and M. Johnston (1996). "Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription." *Mol Cell Biol* 16(11): 6419-26.
- Palmieri, F. (1994). "Mitochondrial carrier proteins." *FEBS Lett* 346(1): 48-54.
- Palmieri, L., H. Rottensteiner, W. Gitzalsky, P. Scarcia, F. Palmieri and R. Erdmann (2001). "Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter." *Embo J* 20(18): 5049-59.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen and M. H. Saier, Jr. (1998). "Major facilitator superfamily." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 1-34.
- Park, Y. C., S. G. Kim, K. Park, K. H. Lee and J. H. Seo (2004). "Fed-batch production of D-ribose from sugar mixtures by transketolase-deficient *Bacillus subtilis* SPK1." *Appl Microbiol Biotechnol* 66(3): 297-302.
- Partch, C. L. and A. Sancar (2005). "Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle." *Photochem Photobiol* 81(6): 1291-304.
- Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski, B. Nelissen, A. Goffeau and M. H. Saier, Jr. (1998). "Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 430(1-2): 116-25.
- Perl, M., E. B. Kearney and T. P. Singer (1976). "Transport of riboflavin into yeast cells." *J Biol Chem* 251(11): 3221-8.
- Persson, B. L., J. Petersson, U. Fristedt, R. Weinander, A. Berhe and J. Pattison (1999). "Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation." *Biochim Biophys Acta* 1422(3): 255-72.
- Pinson, B., M. Merle, J. M. Franconi and B. Daignan-Fornier (2004). "Low affinity orthophosphate carriers regulate PHO gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 279(34): 35273-80.
- Pirner, H. M. and J. Stoltz (2006). "Biotin Sensing in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mediated by a Conserved DNA Element and Requires the Activity of Biotin-Protein Ligase." *J Biol Chem* 281(18): 12381-9.
- Pollard, M. G., K. J. Travers and J. S. Weissman (1998). "Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." *Mol Cell* 1(2): 171-82.
- Praekelt, U. M., K. L. Byrne and P. A. Meacock (1994). "Regulation of THI4 (MOL1), a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 10(4): 481-90.
- Reifenberger, E., E. Boles and M. Ciriacy (1997). "Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression." *Eur J Biochem* 245(2): 324-33.

- Reihl, P. and J. Stoltz (2005). "The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B2) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 280(48): 39809-17.
- Richter, G., M. Fischer, C. Krieger, S. Eberhardt, H. Luttgen, I. Gerstenschlager and A. Bacher (1997). "Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 179(6): 2022-8.
- Richter, G., H. Ritz, G. Katzenmeier, R. Volk, A. Kohnle, F. Lottspeich, D. Allendorf and A. Bacher (1993). "Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 175(13): 4045-51.
- Richter, G., R. Volk, C. Krieger, H. W. Lahm, U. Rothlisberger and A. Bacher (1992). "Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 174(12): 4050-6.
- Robinson, K. M., R. A. Rothery, J. H. Weiner and B. D. Lemire (1994). "The covalent attachment of FAD to the flavoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase is not necessary for import and assembly into mitochondria." *Eur J Biochem* 222(3): 983-90.
- Robzyk, K. and Y. Kassir (1992). "A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast." *Nucleic Acids Res* 20(14): 3790.
- Rogers, T. O. and H. C. Lichstein (1969). "Characterization of the biotin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 100(2): 557-64.
- Said, H. M., A. Ortiz, M. P. Moyer and N. Yanagawa (2000). "Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): C270-6.
- Sambrook, J. F., EF; Maniatis, T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, pp. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Santos, M. A., A. Jimenez and J. L. Revuelta (2000). "Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 275(37): 28618-24.
- Sauer, N., T. Caspari, F. Klebl and W. Tanner (1990). "Functional expression of the Chlorella hexose transporter in *Schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 7949-52.
- Schiestl, R. H. and R. D. Gietz (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." *Curr Genet* 16(5-6): 339-46.
- Schmitt, M. E., T. A. Brown and B. L. Trumppower (1990). "A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* 18(10): 3091-2.

- Schweingruber, A. M., J. Dlugonski, E. Edenthaler and M. E. Schweingruber (1991). "Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport." *Curr Genet* 19(4): 249-54.
- Sellick, C. A. and R. J. Reece (2003). "Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline." *Embo J* 22(19): 5147-53.
- Serrano, R. (1983). "In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase." *FEBS Lett* 156(1): 11-4.
- Sibirnyi, A. A., G. M. Shavlovskii, G. P. Ksheminskaia and A. G. Orlovskaia (1977). "[Active transport of riboflavin in the yeast *Pichia guilliermondii*. Detection and some properties of the cryptic riboflavin permease]." *Biokhimiia* 42(10): 1841-51.
- Sibirnyi, A. A., G. M. Shavlovskii, G. P. Ksheminskaia and A. G. Orlovskaia (1977). "[Riboflavin transport in cells of riboflavin-dependent yeast mutants]." *Mikrobiologija* 46(2): 376-8.
- Siddiqui, A. H. and M. C. Brandriss (1988). "A regulatory region responsible for proline-specific induction of the yeast PUT2 gene is adjacent to its TATA box." *Mol Cell Biol* 8(11): 4634-41.
- Siddiqui, A. H. and M. C. Brandriss (1989). "The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences." *Mol Cell Biol* 9(11): 4706-12.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 122(1): 19-27.
- Sinclair, K., J. P. Warner and D. T. Bontron (1994). "The ASP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase." *Gene* 144(1): 37-43.
- Singer, T. P. and M. K. Johnson (1985). "The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification." *FEBS Lett* 190(2): 189-98.
- Singleton, C. K. (1997). "Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 199(1-2): 111-21.
- Sipiczki, M. (2000). "Where does fission yeast sit on the tree of life?" *Genome Biol* 1(2): REVIEWS1011.
- Stahmann, K. P., J. L. Revuelta and H. Seulberger (2000). "Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production." *Appl Microbiol Biotechnol* 53(5): 509-16.
- Stanbrough, M. and B. Magasanik (1995). "Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 177(1): 94-102.
- Stoltz, J. (2003). "Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* 20(3): 221-31.

- Stolz, J., T. Caspary, A. M. Carr and N. Sauer (2004). "Cell division defects of *Schizosaccharomyces pombe* liz1- mutants are caused by defects in pantothenate uptake." *Eukaryot Cell* 3(2): 406-12.
- Stolz, J., U. Hoja, S. Meier, N. Sauer and E. Schweizer (1999). "Identification of the plasma membrane H⁺-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant." *J Biol Chem* 274(26): 18741-6.
- Stolz, J. and S. Munro (2002). "The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis." *J Biol Chem* 277(47): 44801-8.
- Stolz, J. and N. Sauer (1999). "The fenpropimorph resistance gene FEN2 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter." *J Biol Chem* 274(26): 18747-52.
- Stolz, J. and M. Vielreicher (2003). "Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 278(21): 18990-6.
- Stolz, J., H. J. Wohrmann and C. Vogl (2005). "Amiloride uptake and toxicity in fission yeast are caused by the pyridoxine transporter encoded by bsu1⁺ (car1⁺)." *Eukaryot Cell* 4(2): 319-26.
- Surber, M. W. and S. Maloy (1999). "Regulation of flavin dehydrogenase compartmentalization: requirements for PutA-membrane association in *Salmonella typhimurium*." *Biochim Biophys Acta* 1421(1): 5-18.
- Söllner, T., G. Griffiths, R. Pfaller, N. Pfanner and W. Neupert (1989). "MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins." *Cell* 59(6): 1061-70.
- Tamai, Y., A. Toh-e and Y. Oshima (1985). "Regulation of inorganic phosphate transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 164(2): 964-8.
- te Heesen, S., R. Knauer, L. Lehle and M. Aebi (1993). "Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity." *Embo J* 12(1): 279-84.
- ter Schure, E. G., N. A. van Riel and C. T. Verrips (2000). "The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev* 24(1): 67-83.
- Thoma, F. (1999). "Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair." *Embo J* 18(23): 6585-98.
- Tishler, M., K. Pfister, R. Babson, K. Ladenburg and A. Fleming (1947). "The Reaction between o-Aminoazo Compounds and Barbituric Acid. A New Synthesis of Riboflavin." *J. Am. Chem. Soc.* 69(6): 1487-1492.
- Toh-e, A., K. Tanaka, Y. Uesono and R. B. Wickner (1988). "PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* 214(1): 162-4.

- Tu, B. P., S. C. Ho-Schleyer, K. J. Travers and J. S. Weissman (2000). "Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." *Science* 290(5496): 1571-4.
- Tu, B. P. and J. S. Weissman (2002). "The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." *Mol Cell* 10(5): 983-94.
- Turoscy, V. and T. G. Cooper (1987). "Ureidosuccinate is transported by the allantoate transport system in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 169(6): 2598-600.
- Urban-Grimal, D., B. Pinson, J. Chevallier and R. Haguenauer-Tsapis (1995). "Replacement of Lys by Glu in a transmembrane segment strongly impairs the function of the uracil permease from *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem J* 308 (Pt 3): 847-51.
- van Roermund, C. W., H. R. Waterham, L. Ijlst and R. J. Wanders (2003). "Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Mol Life Sci* 60(9): 1838-51.
- Vitreschak, A. G., D. A. Rodionov, A. A. Mironov and M. S. Gelfand (2002). "Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation." *Nucleic Acids Res* 30(14): 3141-51.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann and P. Philippse (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 10(13): 1793-808.
- Wagner, R., J. de Montigny, P. de Wergifosse, J. L. Souciet and S. Potier (1998). "The ORF YBL042 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a uridine permease." *FEMS Microbiol Lett* 159(1): 69-75.
- Walsh, M. C., H. P. Smits, M. Scholte and K. van Dam (1994). "Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose." *J Bacteriol* 176(4): 953-8.
- Wang, S. S. and M. C. Brandriss (1986). "Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT1 gene." *Mol Cell Biol* 6(7): 2638-45.
- Wang, S. S. and M. C. Brandriss (1987). "Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation, and mitochondrial localization of the PUT1 gene product." *Mol Cell Biol* 7(12): 4431-40.
- Warburg, O. and W. Christian (1932). "Ein neues Oxidationsferment und sein Absorptionsspektrum." *Biochem Z*(242): 438-458.
- Warburg, O. and W. Christian (1933). "Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen." *Biochem Z*(266): 377-411.
- Wiame, J. M., M. Grenson and H. N. Arst, Jr. (1985). "Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi." *Adv Microb Physiol* 26: 1-88.
- Wightman, R. and P. A. Meacock (2003). "The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine." *Microbiology* 149(Pt 6): 1447-60.

- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston and R. W. Davis (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* 285(5429): 901-6.
- Wu, M., B. Repetto, D. M. Glerum and A. Tzagoloff (1995). "Cloning and characterization of FAD1, the structural gene for flavin adenine dinucleotide synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(1): 264-71.
- Wykoff, D. D. and E. K. O'Shea (2001). "Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 159(4): 1491-9.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33(1): 103-19.
- Yoo, H. S., T. S. Cunningham and T. G. Cooper (1992). "The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical." *Yeast* 8(12): 997-1006.
- Zempleni, J., J. R. Galloway and D. B. McCormick (1996). "Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans." *Am J Clin Nutr* 63(1): 54-66.
- Zhang, W., Y. Zhou and D. F. Becker (2004). "Regulation of PutA-membrane associations by flavin adenine dinucleotide reduction." *Biochemistry* 43(41): 13165-74.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jürgen Stolz für die engagierte und gute Betreuung, für sein stetes Interesse und für die vielen anregenden Diskussionen während meiner Doktorarbeit. Ich danke ihm auch dafür, dass er mir als Lebensmittelchemikerin die Chance gegeben hat, diese Arbeit mit einem molekular- und zellbiologischen Thema in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Prof. Dr. Widmar Tanner danke ich für reges Interesse am Fortgang der Arbeit, für hilfreiche Diskussionen und für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen.

Daneben gilt mein Dank Andrea Spitzner, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit wichtige Impulse für einen Teil dieser Arbeit lieferte. Genauso gilt mein Dank meinen „Mitdoktoranden“ Heike Pirner, Stefan Ringlstetter und Christian Vogl für das gute Arbeitsklima und viele hilfreiche Diskussionen.

Weiterhin möchte ich allen Diplomanden und Laboranten der Arbeitsgruppe Stolz danken und zwar: Sandra Balser, Birgit Flauger, Mathias Gerl, Andrea Grundstein, Cornelia Klein, Sabine Laaberer, „Sanni“ Matschi, Manuela Reich, Petra Schitko, Tobi Schwarzmüller, Martin Vielreicher und „Paula“ Wöhrmann. Auch ihr habt sehr zu diesem guten Arbeitsklima beigetragen!

Herzlichen Dank auch an Guido Großmann, der vor allem bei Computerproblemen stets eine kompetente und hilfsbereite Anlaufstelle war.

Danken möchte ich auch allen anderen Arbeitsgruppen dieses Lehrstuhls. Das Betriebsklima hier war immer toll. Besonderer Dank an dieser Stelle noch mal an „Vroni“ Mrosek, die den Betrieb immer am Laufen hielt.

Von den „außeruniversitären“ Personen möchte ich außerdem meinem Freund Dirk danken, der stets bemüht war mich in dieser Zeit zu unterstützen.

Ganz besonders danke ich auch meinen Eltern die mir mein Studium und die Doktorarbeit durch ideelle und finanzielle Unterstützung überhaupt erst ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, den 26. Juni 2006