

**Eine eIF2 verursachte Störung der
Translationsinitiation verändert Glukose-gesteuerte
Prozesse in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHEN MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Franziska Wojciech

aus
Seligenstadt

im Jahr 2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.12.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift: _____

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe 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, Dezember 2020

Wir ernten tatsächlich die Früchte
unserer langen Mühen

Michael Groman an Mary Lasker, 1985

Für meine Liebsten

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	VII
2	ABSTRACT.....	IX
3	EINLEITUNG	1
	3.1..... Glukose – Energielieferant und Signalmolekül.....	2
	3.1.1.....Energiegewinnung in <i>S. cerevisiae</i>	3
	3.1.2..... Glukose gesteuerte Prozesse.....	9
	3.1.2.1....Der Ras-cAMP-PKA-Signalweg.....	11
	3.1.2.2.... Glukose-Repression in <i>S. cerevisiae</i>	12
	3.2.....Zellteilung in <i>S. cerevisiae</i>.....	15
	3.2.1..... Allgemeiner Ablauf des Zellzyklus in <i>S. cerevisiae</i>	16
	3.2.2..... Regulation der G1/S-Transition in <i>S. cerevisiae</i>	18
	3.3..... Translation	21
	3.3.1..... Translationsinitiation.....	22
	3.3.2..... Translationsinitiationsfaktor eIF2	26
	3.3.3..... Regulation der Initiation durch eIF2 α -Phosphorylierung	28
	3.4..... Zielsetzung.....	32
4	ERGEBNISSE	33
	4.1..... Charakterisierung der eIF2-Mutanten.....	33
	4.1.1..... Gcn4-Analysen in eIF2-Mutanten	35
	4.1.2..... Wachstums- und Zellzyklus-Analysen in eIF2-Mutanten.....	37
	4.1.3..... Untersuchung der Zellmorphologie in eIF2-Mutanten	41
	4.1.4..... Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Hefezelle	43
	4.2.....Analyse von mRNAs vor und während der Translation.....	48
	4.2.1..... Verändertes Translationsprofil in eIF2-Mutanten	49
	4.2.2..... Transkriptionsmuster in eIF2-Mutanten	53
	4.2.3..... Analyse der Translationseffizienz in eIF2-Mutanten	56
	4.2.4..... Gene-Ontology-Analyse	61
	4.3..... Veränderte Genexpression atmungsspezifischer Gene	64
	4.3.1..... Veränderte Mitochondrienmorphologie in eIF2-Mutanten	66
	4.3.2..... Transkriptionsfaktor Hap4.....	68
	4.4..... Glukose gesteuerte Prozesse	71
	4.4.1..... Glukose-Repression durch den Transkriptionsfaktor Mig1	73
	4.4.2..... Glukoseinduzierte Prozesse	86
	4.4.2.1.... Verstoffwechselung von Glukose zu Fruktose-1,6-Bisphosphat	87
	4.4.2.2.... Proteinkinase A-Aktivität in <i>cde123-1326</i>	95
	4.4.2.3.... Analyse der Pyruvatkinase	101

5	DISKUSSION	116
5.1.....	Einflussfaktoren der Zellzyklusprogression	118
5.2	Verstärkter oxidativer Metabolismus	120
5.2.1.....	Erhöhte Expression atmungsspezifischer Gene in eIF2-Mutanten ...	120
5.2.2.....	Hyperaktives Snf1 in eIF2-Mutanten	123
5.3	Glykolytischer Fluss in eIF2-Mutanten reduziert.....	127
5.4	Warburg-Effekt – Der veränderte Metabolismus im Tumor.....	131
6	METHODEN	134
6.1.....	Arbeiten mit der Bäckerhefe <i>S. cerevisiae</i>	134
6.1.1.....	Kultivierung, Lagerung und Konservierung der Hefe.....	134
6.1.2.....	Herstellung von Hefestämmen.....	134
6.1.2.1 ...	Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode.....	134
6.1.2.2 ...	Kreuzung, Sporulation und Tetraden-Analyse.....	136
6.1.3.....	Wachstumstest	137
6.1.4.....	Durchflusszytometrie.....	137
6.1.5.....	Lebend-Zell Mikroskopie.....	138
6.1.6.....	<i>GCN4-lacZ</i> Reporter-Assay	140
6.1.7.....	Glukose-Assay	141
6.2	Molekularbiologische Methoden	142
6.2.1.....	Genomische DNA-Isolierung aus Hefe	142
6.2.2.....	RNA Isolierung aus Hefe.....	143
6.2.3.....	Konzentrations- und Reinheitsmessung von DNA und RNA	143
6.2.4.....	Synthese der komplementären DNA	144
6.2.5.....	Designen von Primer	144
6.2.6.....	Polymerasen-Kettenreaktion	145
6.2.6.1 ...	KOD-PCR.....	145
6.2.6.2 ...	Gezielte Mutagenese mittels PCR.....	147
6.2.6.3 ...	Kolonie-PCR.....	148
6.2.6.4 ...	Quantitative-PCR	149
6.2.7.....	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA Proben.....	152
6.2.8.....	Klonierung.....	153
6.2.8.1 ...	Restriktionsverdau.....	153
6.2.8.2 ...	Ligation	154
6.2.8.3 ...	<i>E.coli</i> Transformation Plasmid Präparation und Sequenzierung	154
6.3	Proteinanalytische Methoden	156
6.3.1.....	Herstellung von Proteinlysaten aus der Hefe.....	156
6.3.2.....	Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford.....	156
6.3.3.....	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	156

6.3.4.....	Western-Blot und immunologischer Proteinnachweis.....	158
6.3.5.....	Polysomen-Profile	158
6.3.5.1....	Herstellung des Saccharose-Gradienten.....	159
6.3.5.2....	Lyse der Zellen und Polysomen-Profil.....	159
6.4.....	RNA-Sequenzierung und Auswertung.....	161
7	MATERIAL	162
7.1.....	Medien, Puffer & Lösungen	162
7.2.....	Nukleinsäuren, Enzyme und Kits	166
7.3.....	Proteine	167
7.4.....	Hefestämme, Plasmide und Oligonukleotide	168
7.5.....	Internetseiten, Software und Makros	186
7.5.1.....	Internetseiten für die Primer Herstellung	186
7.5.2.....	Software und Datenbanken.....	187
7.5.3.....	Makros für Image J.....	187
8	LITERATURVERZEICHNIS	190
9	VERZEICHNISSE	210
9.1.....	Abkürzungsverzeichnis.....	210
9.2.....	Abbildungsverzeichnis.....	215
9.3.....	Tabellenverzeichnis	217
9.4.....	Formelverzeichnis.....	217
10	ANHANG.....	218
10.1.....	Daten auf der beigefügten CD.....	218
10.2.....	Zusätzliche Abbildungen.....	218
11	LEBENS LAUF	225
12	DANKSAGUNG	226

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein fakultativ anaerober Organismus, deren bevorzugter Stoffwechsel in Anwesenheit von Sauerstoff und Glukose die Fermentation ist. Aerobe Fermentation findet auch in Tumorzellen statt, wie schon zuvor von Otto Warburg beschrieben. Hat die Hefe die Glukose verbraucht, kann sie den gewonnenen Ethanol als Kohlenstoffquelle über die Atmung verwerten. In dieser Phase sind Zellproliferation und Proteinbiosynthese vermindert. Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2) spielt innerhalb der initiiierenden Schritte der Proteinsynthese eine zentrale Rolle. Der eIF2-Komplex besteht aus 3 Untereinheiten (eIF2 α , β und γ), von denen die Untereinheit γ zu den GTPasen gehört. eIF2 bindet GTP und liefert die Initiator-Methionin-tRNA ($\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$) an das Ribosom. Der gebildete Präinitiationskomplex, bestehend aus eIF2-GTP, der 40S (Svedberg) ribosomalen Untereinheit und anderen Initiationsfaktoren (43S-Präinitiationskomplex PIK), kann an die prozessierten mRNAs binden. Der 43S-PIK scannt die mRNA bis das Startcodon erreicht ist. Nachdem das Startcodon erkannt wurde, erfolgt die Termination des Scanningprozesses. Hierbei ist der entscheidende Schritt die Hydrolyse des eIF2-GTP zu eIF2-GDP, gefolgt von der eIF2-Dissoziation vom Komplex. Durch die Katalyse von eIF2B, einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, kann eIF2 für den nächsten Zyklus reaktiviert werden. Neben der Initiation der Translation hat eIF2 zudem eine regulatorische Funktion. Durch unterschiedliche Arten von Stress wie Aminosäuremangel, wird eIF2 α durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. Die Phosphorylierung von eIF2 interferiert mit dem Nukleotid-Austausch und führt zu einer Hemmung der globalen Translation. Gleichzeitig werden bestimmte mRNAs, wie *GCN4*, verstärkt translatiert. Der Assemblierungsfaktor von eIF2, Cdc123, wurde zuerst in einer temperaturempfindlichen Ratten-Fibroblasten-Zelllinie beschrieben. Diese Zellen konnten bei bestimmten Temperaturen nicht den G1/S-Übergang einleiten. In *S. cerevisiae* konnten Mutationen in *CDC123* gleiche Zellzyklus Defekte auslösen. Somit ist das Protein nicht nur für eine richtige Assemblierung von eIF2 verantwortlich, sondern auch für den Zellzykluseintritt notwendig. Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Depletionen einer eIF2- oder einer eIF2B-Untereinheit zu einem verspäteten Zellzykluseintritt führten. Dies konnte jedoch nicht bei anderen Initiationsfaktoren beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde deshalb durch RNA-Sequenzierung untersucht, welche mRNAs auf eine verminderte eIF2 Funktion reagieren.

In der Arbeit war es möglich, durch die Störung der eIF2-Funktion eine veränderte Glukose-gesteuerte Genexpression zu detektieren. Mithilfe von RNA-Sequenzierungsdaten konnte durch unterschiedliche Analyseverfahren ein verändertes Expressionsmuster in den eIF2-Mutanten festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass neben der erhöhten Expression der atmungsspezifischen Gene, die Mitochondrienstruktur in den eIF2-Mutanten verändert vorlag. Gene, die im Wachstum mit Glukose reprimiert vorliegen, wurden in den Translationsinitiationsmutanten verstärkt abgelesen. Die verringerte Reg1-Menge, in den eIF2-Mutanten, ist

möglicherweise für die erhöhte Snf1-Aktivität und die reduzierte Kernlokalisation von Mig1 verantwortlich. Dadurch erfolgt eine Derepression der Glukose-reprimierten Gene. Zudem läuft vermutlich der glykolytische Fluss in den eIF2-Mutanten verlangsamt ab. Bei einer Deletion des Gens für die Trehalose-6-Phosphat Synthase (*TPS1*) kommt es zu einem unkontrollierten Zufluss von Glukose und zu einer Wachstumsunfähigkeit der Zellen. Die Doppeldeletion (*tps1Δ cdc123-Δ326*) konnte jedoch wieder auf Glukose wachsen. Dies bestätigt die Annahme des verminderten glykolytischen Flusses in der Mutante. Der verzögerte Zellzykluseintritt der eIF2-Mutane könnte eine Folge des verringerten glykolytischen Flusses sein, so wie es in den Einfachmutanten (*hxx2Δ* oder *pfk1/2Δ*) zu sehen war. Eine weitere Folge des reduzierten glykolytischen Flusses ist die reduzierte Menge von Fruktose-1,6-Bisphosphat. Dies führt, durch weniger GTP-gebundenes Ras2, zu einem niedrigeren cAMP-Spiegel und dadurch einer verringerten PKA-Aktivität. Liegt eine reduzierte PKA-Aktivität vor, kommt es ebenfalls zu einem verzögerten Zellzykluseintritt. In der eIF2-Mutante war es durch ein dauerhaft aktives Ras2 möglich, den Zellzykluseintritt zu beschleunigen. Die GFP fusionierte Pyruvatkinase Cdc19 bildete bei einer ausreichenden Glukosekonzentration Kondensate. Lag ein verringerter glykolytischer Fluss (durch *hxx2Δ* oder *pfk1/2Δ*) oder eine verminderte PKA-Aktivität (durch *pTEF-PDE2*) vor, so wurden weniger Kondensate detektiert. In der eIF2-Mutante wurden ebenfalls kaum Cdc19-GFP-Kondensate gefunden. Die gefundene Struktur wirkt als eine Art Indikator für einen schnellen glykolytischen Fluss, der in den eIF2-Mutanten wahrscheinlich verlangsamt abläuft. Die Inhibierung der Translationsinitiation führt allen Anschein nach zu einer verstärkten Atmung, gekoppelt mit einem verminderten glykolytischen Fluss.

Die gesamten Ergebnisse deuten auf einen veränderten Metabolismus im Zuge der verminderten eIF2-Funktion hin. Dieser veränderte Stoffwechsel könnte der Auslöser für die verlangsamte Zellproliferation sein. In Tumorzellen wurden unterschiedliche Ansätze angewendet, um den glykolytischen Fluss und die damit verbundene Zellproliferation zu inhibieren. Eine mögliche eIF2 spezifische Metabolismus-Änderung, die einen verlangsamten Zellzykluseintritt nach sich zieht, macht eIF2 zu einem interessanten Kandidaten in der Krebsforschung.

2 ABSTRACT

The baker's yeast *S. cerevisiae* is a facultative anaerobic organism. Its preferred metabolism in the presence of oxygen and glucose is fermentation. Aerobic fermentation takes place also in tumor cells, as first described by Otto Warburg. Once yeast has consumed the glucose, it can utilize the obtained ethanol as a carbon source via respiration. Cell proliferation and protein biosynthesis are reduced during this phase. The eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) plays a central role within the initiating steps of protein synthesis. The eIF2 complex consists of 3 subunits (eIF2 α , β and γ), whereof the γ subunit belongs to the GTPases. eIF2 binds GTP and delivers the initiator methionine-tRNA (tRNA_i^{Met}) to the ribosomes. The formed initiation complex, consisting of eIF2-GTP, the 40S ribosomal subunit and other initiation factors (43S-preinitiation complex PIC), can further bind processed mRNAs. The 43S-PIC is scanning the mRNA until reaching of the start codon. After start codon recognition the scanning process is terminated. The determining step is the hydrolysis of the eIF2-GTP to eIF2-GDP and consequently the dissociation of eIF2 from the complex. eIF2 can be reactivated for the next cycle by catalysis of eIF2B, a guanine nucleotide exchange factor. In addition to its role in the translation initiation mechanism, eIF2 also has a regulatory function. Through different forms of stress, for example amino acid starvation, the α subunit of eIF2 becomes phosphorylated by specific kinases. The phosphorylation of eIF2 interferes with nucleotide exchange and leads to an inhibition of the global translation and at the same time an up-regulation of certain mRNAs like *GCN4*. The assembly factor of eIF2, Cdc123, was first described in a temperature-sensitive rat fibroblast cell line, which was not competent for a G1/S-transition at the restrictive temperature. Similar cell cycle defects were also caused by *CDC123* mutations in *S. cerevisiae*. Thus, the protein is not only responsible for the correct assembly of eIF2, but it is also necessary for cell cycle entry. Work in the lab showed that depletions of subunits of eIF2 or eIF2B led to a delayed cell cycle entry. However, this could not be observed with other initiation factors. In this thesis it is therefore investigated by RNA sequencing which mRNAs react to a reduced eIF2 function.

In this work, it was possible to detect altered glucose-controlled gene expression due to the disruption of the eIF2 function. With the help of RNA sequencing data, a changed expression pattern in the eIF2 mutants could be detected by different methods. It could be shown that in addition to the increased expression of the respiration-specific genes, the mitochondrial structure in the eIF2 mutants was altered. Genes that are repressed in growth with glucose were increasingly transcribed in translation initiation mutants. The reduced amount of Reg1 in the eIF2 mutants may be responsible for the increased Snf1 activity and reduced nuclear localization of Mig1. This leads to a derepression of the glucose repressed genes. Additionally, the glycolytic flux is probably reduced in the eIF2 mutants. A deletion of the gene for trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) leads to an uncontrolled influx of glucose and to an inability of the cells to grow. However, the double deletion (*tps1 Δ cdc123- Δ 326*) could grow on glucose. This confirms

the assumption of reduced glycolytic flux in the mutants. The delayed cell cycle entry of the eIF2 mutant could be a consequence of the decreased glycolytic flux as seen in the single mutants (*hxxk2Δ* or *pfk1/2Δ*). Another consequence of the lowered glycolytic flux is the reduced amount of fructose-1,6-bisphosphate. This leads to reduced PKA activity due to less GTP-bound Ras2. Decreased PKA activity because of low cAMP level is a known cause of delayed cell cycle entry. In the eIF2 mutant it was possible to accelerate cell cycle entry by a constitutive active Ras2. The GFP fused pyruvate kinase, Cdc19, formed condensates at a sufficient glucose concentration. In case of a decreased glycolytic flux (through *hxxk2Δ* or *pfk1/2Δ*) or a reduced PKA activity (through *pTEF-PDE2*), fewer condensates were detected. In the eIF2 mutant also hardly any Cdc19-GFP condensates were found. The structure may serve as an indicator for a high glycolytic flux, which is probably at a slower rate in the eIF2 mutants. Inhibition of translation initiation seems to lead to increased respiration coupled with a reduced glycolytic flux.

Overall, the results indicate an altered metabolism due to the decreased eIF2 function. This altered metabolism could be the cause for the reduced cell proliferation. Different approaches have been used in tumor cells to inhibit glycolytic flux and the associated cell proliferation. A possible eIF2-specific metabolic change, which results in a slower cell cycle entry, makes eIF2 an interesting candidate in cancer research.

3 EINLEITUNG

In der Genetik hat sich die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) als hervorragender Modellorganismus durchgesetzt, da sie sowohl im haploiden als auch im diploiden Zustand untersucht werden kann (Zeyl, 2000). Auch war *S. cerevisiae* das erste eukaryotische Genom, welches komplett sequenziert wurde (Goffeau et al., 1996). Das Wachstum der Hefe ist sowohl in statischer Kultur als auch in einer kontinuierlichen Kultur möglich (Busti et al., 2010). In einer statischen Kultur erfolgt eine Zunahme der Zellzahl im gleichen Medium, wohingegen in der kontinuierlichen Kultur die Zusammensetzung des Mediums durch ein Fließsystem konstant bleibt. In statischen Kulturen kann das Wachstum der Bäckerhefe untersucht und eingeteilt werden (Abbildung 3-1). Wenn Hefe in ein Medium mit Glukose überführt und beobachtet wird, dann erfolgt zunächst eine Anlaufphase, gefolgt vom exponentiellen Wachstum. Nach dem Aufbrauchen der Glukose erfolgt der diauxische Wechsel, in der es zu einer genetischen Umprogrammierung in der Zelle kommt. Hier werden nun zuvor inhibierte Gene abgelesen. Die Zelldichte nimmt nur noch langsam zu und nach mehreren Tagen liegen die Zellen in der stationären Phase vor.

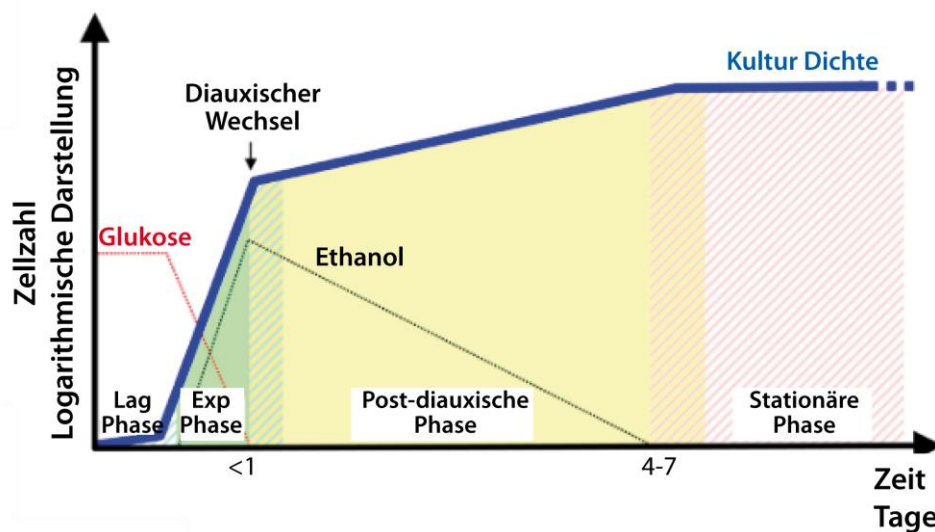


Abbildung 3-1: Wachstumsphasen der Bäckerhefe. Darstellung y-Achse logarithmisch, x-Achse ist die Zeit in Tagen aufgetragen. Zellen verbrauchen in der exponentiellen Phase (grün) Glukose und zunächst wird Ethanol gebildet. Nach Glukoseverbrauch erfolgt der diauxische Wechsel (grün gestrichelt). Ethanol wird als Kohlenstoffquelle herangezogen und in der Post-diauxischen Phase (gelb) verbraucht. Nur noch ein geringer Zuwachs an Zellen erfolgt (blau). Nach etwa 4-7 Tagen liegen die Zellen stationär vor (rot), die Zell-Dichte nimmt drauf hin nicht weiter zu (Abbildung verändert nach Busti et al., 2010).

In *S. cerevisiae* wird Glukose zum einen für die Energiegewinnung benötigt. Zudem erfüllt es als Signalmolekül eine Schlüsselfunktion in den Zellen (Ashe et al., 2000). Die Nährstoffumgebung legt fest, wie sich die Hefezellen verhalten. Ist Glukose verbraucht, durchlaufen die Zellen unterschiedliche Veränderungen (Allen et al., 2006; Davidson et al., 2011; Miles et al., 2013). Ein Teil der Zellen gehen in das ruhende Stadium, die G_0 -Phase, über. Sie knospen nicht und beginnen zu atmen. Der G1/S-Übergang findet daraufhin erst wieder statt, wenn die

Bedingungen es zulassen. Die Expression der Gene, die für die G1-Cycline codieren, wird während des diauxischen Wechsels inhibiert (Mai & Breeden, 1997). Neben dem Zellzyklus reagiert auch die Genexpression sowie die Proteinbiosynthese auf Umwelteinflüsse wie Nährstoffmangel. So führt die Depletion von Glukose zur Inhibierung der Translationsinitiation (Ashe et al., 2000).

Die Hefe ist ein sich schnell teilender, fakultativ anaerober Organismus. Analysen der Stoffwechsel- und Signalwege sowie die Untersuchung des Zellzyklus sind daher von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Translationskontrolle, Zellzykluseintritt und Veränderungen des Glukosemetabolismus untersucht. In den kommenden Kapiteln wird daher auf die jeweiligen Aspekte näher eingegangen.

3.1 Glukose – Energielieferant und Signalmolekül

Die Bäckerhefe ist ein fakultativ anaerober Organismus, das heißt, dass die Zellen auch ohne Sauerstoff überleben und Energie gewinnen können (Otterstedt et al., 2004). Der favorisierte Stoffwechselweg der Hefe ist die Gärung, oder auch Fermentation genannt. Hier wird Glukose aufgenommen, über die Glykolyse verstoffwechselt und Ethanol produziert. Die Fermentation ist ein Prozess, bei dem schnell Energie gewonnen werden kann. Pasteur hatte 1860 die alkoholische Gärung in der Hefe nachgewiesen und erkannt, dass Zucker zu Ethanol schneller umgesetzt wird, wenn der Hefe kein Sauerstoff zur Verfügung steht (Stickland, 1956). Daraufhin wurde 1929 von Crabtree festgestellt, dass die Hefe unter normalen Wachstumsbedingungen, unabhängig von der Sauerstoff-Verfügbarkeit, Fermentation betreibt (De Deken, 1966). Die Glukosekonzentration im Medium ist hierfür das einzige Kriterium. Interessanterweise wurde in Tumorzellen die aerobe Gärung ebenfalls als präferierter Stoffwechselweg beschrieben (Warburg, 1956). Der Warburg-Effekt beschreibt eine erhöhte Glukose-Aufnahme sowie ein erhöhter Metabolismus in Tumorzellen, ohne mehr Sauerstoff zu verbrauchen (Warburg, 1956; Weinhouse et al., 1956; Wu & Zhao, 2013). Da die Energiegewinnung über die Gärung geringer ist als durch die Atmung, nimmt die Hefe über die Hexose-Transporter viel Glukose auf (Boles & Hollenberg, 1997). Je nach verfügbarer Glukosemenge werden unterschiedliche Transporter exprimiert. Hat die Hefe die komplette Glukose im Medium verbraucht, erfolgt eine Umprogrammierung der Zellen (Galdieri et al., 2010). Die zuvor durch Glukose-reprimierten Gene werden angeschaltet und die Zelle befindet sich in dem diauxischen Wechsel. Energie wird daraufhin unter aeroben Bedingungen durch Atmung gewonnen, wobei keine Ethanol-Produktion stattfindet (Käppeli, 1986).

Bei der Verstoffwechselung von alternativen, schlecht fermentierbaren Kohlenstoffquellen werden andere Stoffwechselwege eingeschaltet. Raffinose, ein Trisaccharid, muss zunächst gespalten werden (Zhou et al., 2017). Hierfür wird eine Invertase, codiert von *SUC2*, benötigt. Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung von Fruktose. Die entstehende Melibiose, ein Disaccharid aus Glukose und Galaktose, wird daraufhin durch die α -Galaktosidase in beide Bestandteile

hydrolysiert. Der durch die α -Galaktosidase vermittelte Stoffwechselweg von Raffinose zu Saccharose und Galaktose, wurde ebenfalls beobachtet. Die entstandene Saccharose kann daraufhin in Glukose und Fruktose hydrolysiert werden. Die Expression von *SUC2* wird unter Glukose-Bedingungen durch Mig1, einem Transkriptionsrepressor, reprimiert. Raffinose gehört, wegen der vorangeschalteten Spaltung, zu den Kohlenstoffquellen die schlecht fermentierbar sind. Gene, die für die Atmung codieren, werden unter diesen Bedingungen dereprimiert (Guaragnella et al., 2013). Im Gegensatz zu Raffinose kann Glycerin nicht in der Glykolyse verwertet werden (Sprague & Cronan, 1977). Die Verstoffwechselung des C3-Körpers kann auch unter aeroben Bedingungen ablaufen. Hierbei wird der Zuckeralkohol in den Mitochondrien in 2 Schritten zu Dihydroxyaceton degradiert. Dihydroxyaceton kann daraufhin für die Gluconeogenese eingesetzt werden. Die Gene, die für die Enzyme der Gluconeogenese codieren, werden erst nachdem Glukose verbraucht wurde, exprimiert (Grauslund & Rønnow, 2000). Die Regulation des Gens *GUT1*, was für die Glycerinkinase codiert, erfolgt durch die Snf1-Kinase und dem HAP-Transkriptionskomplex.

Bei Glukosemangel konnte neben dem veränderten Metabolismus zudem eine veränderte mitochondriale Struktur wahrgenommen werden (Egner et al., 2002). Die Struktur ist während des Wachstums mit Glukose einfach und unverzweigt. Wachsen die Zellen mit einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle, ist die Mitochondrienstruktur vernetzt und komplexer.

Die Hefezellen sind, durch die Aufnahme von Glukose, in der Lage ATP zu generieren. Außerdem ist die Glukosekonzentration entscheidend für die Wahl des Stoffwechselwegs. Glukose induziert zudem regulatorische Mechanismen, die neben der Verwertung des Zuckers eine entscheidende Rolle spielen.

3.1.1 Energiegewinnung in *S. cerevisiae*

Wie schon im vorangegangenen Abschnitt erklärt, ist die Glukosekonzentration entscheidend für die Wahl des genutzten Stoffwechselwegs zur Energiegewinnung (Barnett, 2003; Galdieri et al., 2010). Wobei die aufgenommene Glukose zunächst über die Glykolyse prozessiert wird und dann entweder die Fermentation oder die Respiration, je nach vorhandener Glukosekonzentration, abläuft. Der Ablauf der Glykolyse ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

Ist eine ausreichende Menge an Glukose im Medium vorhanden, wird diese mithilfe der Sensoren erkannt und durch die Hexose-Transporter aufgenommen (Bisson et al., 1993; Kruckeberg, 1996). Die Bäckerhefe hat 20 Gene, die für diese Transporter codieren (*HXT1-HXT17* sowie *GAL2*, *SNF3* und *RGT2*). Bis auf Hxt12, können alle Hxts sowie Gal2 Glukose transportieren (Wieczorke et al., 1999). Die Hexose-Transporter haben unterschiedliche Glukose-Affinitäten und werden unterschiedlich stark exprimiert, je nach extrazellulärer Glukosemenge (Özcan & Johnston, 1995; Reifenberger et al., 1997). Transporter mit einer niedrigeren Affinität sind Hxt1 und 3, wohingegen Hxt6,7 und Gal2 eine hohe Affinität besitzen.

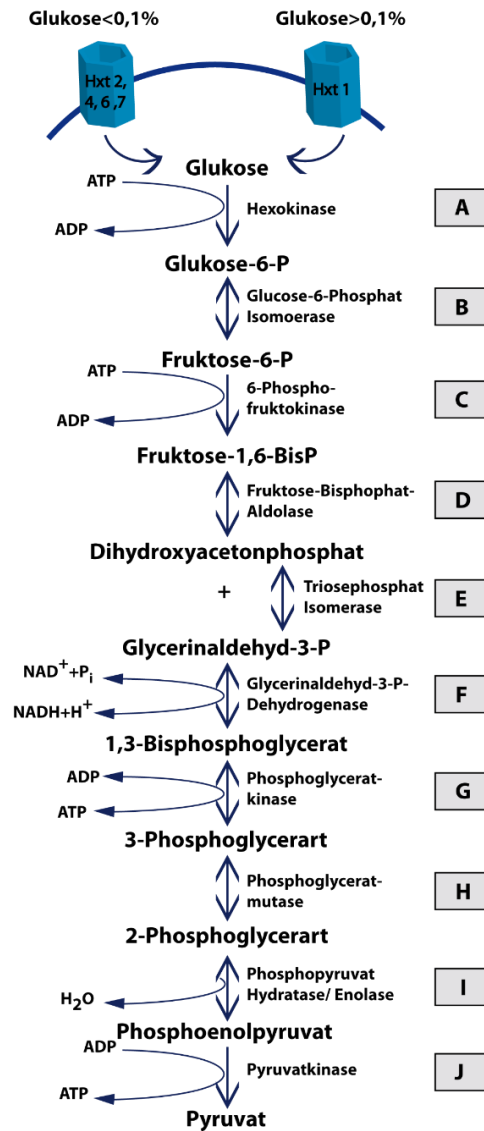


Abbildung 3-2: Ablauf der Glykolyse. Die Glukose-Verfügbarkeit wird über Sensoren erkannt. Daraufhin wird die Glukose über die Hexose-Transporter (Hxts) aufgenommen. Eine erhöhte Expression der Hxts mit geringer Affinität (Hxt1) erfolgt, wenn eine hohe Substratmenge und die Expression der Hxts mit hoher Affinität (Hxt6,7) erfolgt, wenn eine niedrige Substratmenge zur Verfügung steht. **A**, Die aufgenommene Glukose wird durch die Hexokinase phosphoryliert, wobei ATP als Donor fungiert. **B**, Die stoffwechselaktive Form von Glukose wird durch die Glukose-6-Phosphat (P) Isomerase zu Fruktose-6-P isomerisiert. **C**, Durch die 6-Phosphofruktokinase erfolgt eine Phosphorylierung an dem C1. Auch hier wird ATP benötigt. Fruktose ist an den Stellen 1 und 6 phosphoryliert. **D**, Im nächsten Schritt erfolgt die Spaltung des Produktes durch die Fruktose-Bisphosphat-Aldolase in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-P, beides C3-Körper. **E**, Durch die Triosephosphat-Isomerase wird das Gleichgewicht beider Produkte eingestellt, da es zuvor stark auf der Seite von Dihydroxyacetonphosphat liegt, allerdings Glycerinaldehyd-3-P für das Fortschreiten benötigt wird. **F**, Durch Dehydrierung von Glycerinaldehyd-3-P zu 1,3-Bisphosphoglycerat wird das abgespaltene Wasserstoffmolekül auf das NAD⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) übertragen. Glycerinaldehyd-3-P erhält an der C1-Stelle ein Phosphat. **G**, Das Phosphat des energiereichen 1,3-Bisphosphoglycerat wird durch die Phosphoglyceratkinase auf ein ADP (Adenosindiphosphat) übertragen, wodurch 3-Phosphoglycerat und ATP entsteht. **H**, Die Phosphoglyceratmutase wandelt das Produkt in 2-Phosphoglycerat um. **I**, Durch die Abspaltung von Wasser mithilfe der Phosphopyruvat Hydratase, bzw. Enolase, entsteht Enolester Phosphoenolpyruvat, welches eine energiereiche Phosphatgruppe trägt. **J**, Diese Phosphatgruppe wird durch die Pyruvatkinase auf ein ADP übertragen und die Reaktion zum Pyruvat findet statt. Pfeile in einer Richtung, irreversibel, in beide Richtungen, reversibel (Abbildung verändert nach Barnett, 2003; Schlegel, 2006).

Bei einer geringeren Glukosekonzentration im Medium werden die Transporter mit einer hohen Affinität ($K_M \text{ Glukose} = 1\text{-}2 \text{ mM}$) stärker exprimiert. Snf3 und Rgt2 wurden zunächst auch als Transporter charakterisiert, da sie Strukturähnlichkeiten zu den Hexose-Transportern aufweisen (Özcan & Johnston, 1995; Özcan et al., 1998). Untersuchungen ergaben allerdings, dass beide eine regulatorische statt einer metabolischen Funktion besitzen. Beide Proteine sind Membranproteine, die als Glukosesensor fungieren und keine Glukose transportieren können (Özcan et al., 1996; Özcan et al., 1998). Auch die Sensoren nehmen unterschiedliche Glukosekonzentrationen wahr, wobei Snf3 niedrige Konzentrationen detektiert und die Genexpression von Transportern mit hoher Affinität induziert (Özcan et al., 1998). Die aufgenommene Glukose wird über mehrere Schritte und unter Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Pyruvat verstoffwechselt (Barnett, 2003; Bisson et al., 1993). Aus einem Glukosemolekül entstehen dann 2 Pyruvat, 2 ATP und 2 NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid H). Bei den enzymatischen Schritten von Glukose zu Glukose-6-Phosphat und der anschließenden Bildung von Fruktose-1,6-Bisphosphat wird ATP benötigt.

In der Glykolyse gibt es mehrere Schlüsselenzyme. Den ersten Schritt der Glykolyse können drei Enzyme (Hxk1/2 und Glk1) katalysieren. Die Hxk2 ist allerdings das Hauptenzym, wenn ausreichend Glukose verfügbar ist. *HXK1* und *GLK1* werden unter diesen Bedingungen inhibiert. Eine Expression dieser Gene erfolgt, wenn die Glukose im Medium aufgebraucht wurde. *HXK2* liegt nicht nur stärker exprimiert vor, sondern Hxk2 ist auch für die Repression der anderen zwei Gene verantwortlich. Neben der Lokalisation im Cytoplasma konnte zusätzlich eine Kernlokalisierung festgestellt werden (Randez-Gil et al., 1998). Untersuchungen ergaben, dass Hxk2, zusätzlich zur Katalyse des ersten Schrittes in der Glykolyse, auch für die Glukose abhängige Repression bestimmter Gene notwendig ist (Herrero et al., 1998). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde eine direkte Interaktion mit Mig1, ein Transkriptionsrepressor (siehe 3.1.2.2), festgestellt (Moreno et al., 2005).

In der Hefe gibt es zwei unterschiedliche Speicher für Glukose, Glykogen und Trehalose (François & Parrou, 2001; Vicente et al., 2018). Die Trehalose ist ein aus zwei α -1,1 Glukosemolekülen bestehendes Disaccharid. Die Synthese von Trehalose erfolgt über einen Trehalose-Komplex, der sich aus 4 Untereinheiten aufbaut (Tps1-3 und Tsl1). Die Synthase Tps1 katalysiert den Schritt von Glukose-6-Phosphat zu Trehalose-6-Phosphat (Abbildung 3-3). Tps1 dephosphoryliert das Produkt zu Trehalose, was nicht nur als Kohlenhydratspeicher dient, sondern auch Proteine bei hoher Temperatur vor Degradation schützt (Singer & Lindquist, 1998). Wachsen die Zellen in Medium mit Glukose, ist Tps1 notwendig, um den Fluss der Glykolyse zu regulieren (Blázquez et al., 1993). Trehalose-6-Phosphat inhibiert die Hxk2, was zu einem geringeren glykolytischen Fluss führt. Bei einer *TPS1*-Deletion kommt es zu einem unkontrollierten Zufluss von Glukose und zu einer Wachstumsunfähigkeit der Zellen (Aelst et al., 1993; Peeters et al., 2017). Durch diesen unkontrollierten Zufluss häufen sich Metabolite der Glykolyse an, die oberhalb von Glycerinaldehyd-3-Phosphat liegen (vgl. Abbildung 3-2 A-E). Vor

allen jedoch akkumuliert Fruktose-1,6-Bisphosphat, was zu einem starken ATP-Verbrauch führt (Peeters et al., 2017; Thevelein & Hohmann, 1995). Bei gleichzeitiger Deletion von Hexokinase 2 kann, aufgrund des inhibierten Glukosezuflusses, das Wachstum wiederhergestellt werden (Hohmann et al., 1993). Neben der Notwendigkeit von Tps1 in Zellen, die auf Glukose wachsen, konnte gezeigt werden, dass Trehalose-6-Phosphat die Glukose-Repression beeinflusst (Vicente et al., 2018). Es fungiert als eine Art Sensormolekül und fördert die Fermentation. Haben die Zellen die Glukose aufgebraucht oder eine andere Nährstoffeinschränkung liegt vor, wird Trehalose akkumuliert. Das Disaccharid spielt vermutlich in der Hungerperiode eine wichtige Rolle, da es bei Glukosemangel kontinuierlich abgebaut wird (Lillie & Pringle, 1980).

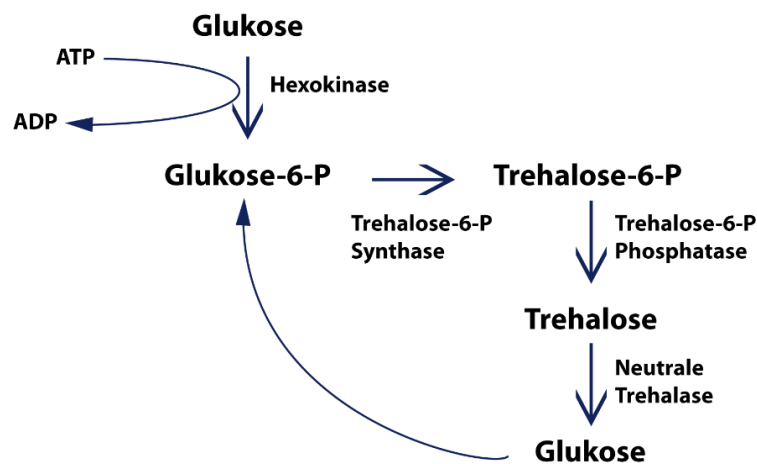


Abbildung 3-3: Trehalose Speicher in *S. cerevisiae*. Mithilfe der Trehalose-6-P-Synthetase (Tps1) wird aus 2 Glukosemolekülen ein Disaccharid gebildet (2 α -1,1 glykosidische verknüpfte Glukosemoleküle). Durch die Trehalose-6-P-Phosphatase erfolgt die Abspaltung von Phosphat und der Speicherstoff Trehalose steht zur Verfügung. Die neutrale Trehalase (Nth1) katalysiert in exponentiell wachsenden Zellen die Spaltung von Trehalose in 2 Glukosemoleküle (Abbildung vereinfacht dargestellt und verändert nach Nwaka & Holzer, 1997; Peeters et al., 2017).

Die Spaltung von Trehalose erfolgt über die drei unterschiedlichen Trehalasen Nth1/2 und Ath1, wobei der Abbau hauptsächlich durch die neutrale Trehalase Nth1 initiiert wird (Eleutherio et al., 2015; Nwaka et al., 1995). Die höchste Enzymaktivität liegt in den Zellen vor, die sich in der exponentiellen Phase befinden. Sobald keine Glukose mehr zur Verfügung steht und die Zellen in die Respiration übergehen, ist Nth1 inaktiv (Eleutherio et al., 2015; Thevelein, 1984). In Stresssituationen kann die Trehalose nicht durch das inaktive Nth1 abgebaut werden. Es erfolgt ein Export des Disaccharids aus den Zellen mithilfe des Trehalose-Transporters (Mal11) (Eleutherio et al., 2015). Die Expression des Transportes wird erst nachdem keine Glukose mehr verfügbar ist, verstärkt exprimiert. Durch die Ath1 Trehalase, die an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wird nach dem Stress die Trehalose degradiert (Eleutherio et al., 2015; He et al., 2009; Jules et al., 2008). Die höchste Expression von Ath1 konnte in Zellen gefunden werden, die Glukose im Medium aufgebraucht haben (Garre et al., 2009). Wenn Glukose wieder zugefügt wurde und Nth1 aktiv vorlag, ist die saure Trehalase inaktiv (Eleutherio et al., 2015; Kim et al., 1996).

Eine weitere Schlüsselreaktion innerhalb der Glykolyse ist die Katalyse von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat (Heinisch et al., 1996; Tijane et al., 1979; Abbildung 3-2 C). Das Enzym für diesen Reaktionsschritt ist heterooktamerisch und wird in der Hefe von den Genen *PFK1/2* codiert. Durch das katalysierte Fruktose-2,6-Bisphosphat wird die Substrat-Affinität von Pfk erhöht (Nissler et al., 1983; Xu et al., 2012). Die Regulation von Pfk1/2 macht Fruktose-1,6-Bisphosphat zu einem stark kontrollierten Metabolit (Hers, 1984; Peeters et al., 2017). Pfk2 wird außerdem von der Protein-Kinase A (PKA) phosphoryliert, was zu einer erhöhten Menge an Fruktose-2,6-Bisphosphat führt (Xu et al., 2012). Durch diese Regulation und der Aktivität von Pfk1 wird der glykolytische Fluss verbessert (Kretschmer & Fraenkel, 1991; Xu et al., 2012). Fruktose-1,6-Bisphosphat ist zum einen Aktivator von Ras, indem es seine Wirkung durch Cdc25, der GEF-(„*Guanosine triphosphate Exchange Factor*“) Faktor von Ras, entweder direkt oder indirekt ausübt (Peeters et al., 2017). Zum anderen bindet und aktiviert Fruktose-1,6-Bisphosphat im letzten Schritt der Glykolyse die Pyruvatkinase (Xu et al., 2012; Abbildung 3-2 J). Die allosterische Regulierung von Fruktose-1,6-Bisphosphat ist ein notwendiger Mechanismus, damit ein Gleichgewicht zwischen Substrat- und Produktkonzentration erhalten bleibt (Fishbein et al., 1975; Jurica et al., 1998).

Die Katalyse von Phosphoenolpyruvat ist nicht nur wegen der Regulation ein wichtiger Schritt, sondern sie liefert der Zelle auch Energie in Form von ATP (Jurica et al., 1998). In der Hefe codieren zwei Gene für die Kinasen *CDC19* und *PYK2*, wobei Cdc19 für die Katalyse und das Wachstum der Zellen in Glukose essenziell ist (Boles et al., 1997). Auch die Phosphorylierung von Cdc19 durch PKA am Serin 22 aktiviert die Kinase (Portela et al., 2002, 2006). Nach dem Aufbrauchen der Glukose im Medium häuft sich Phosphoenolpyruvat an, da die Aktivität von Cdc19 direkt unterdrückt wird (Xu et al., 2012). Die Anhäufung des Substrates ist nicht von der PKA-Phosphorylierung abhängig. Die Menge an Phosphoenolpyruvat wird durch die allosterische Aktivierung von Cdc19 durch Fruktose-1,6-Bisphosphat kontrolliert.

In mehreren Studien konnten Cdc19-Strukturen in der Zelle gefunden werden (Cereghetti et al., 2018; Jin et al., 2017; Saad et al., 2017). Die Pyruvatkinase besitzt, wie auch viele andere Proteine, Regionen mit niedriger Komplexität (LCR „*low complexity regions*“) (Cereghetti et al., 2018; Saad et al., 2017). Die reversible Bildung von Aggregaten ist häufig von solchen Regionen abhängig. In Cdc19 konnten reversible Aggregate nach Glukosemangel detektiert werden. Auch hier ist die LCR für die Aggregatbildung verantwortlich. In den Zellen liegt Cdc19 in einem Gleichgewicht zwischen Monomeren und Homotetrameren vor, wobei die Tetramerbildung durch Bindung von Fruktose-1,6-Bisphosphat reguliert wird (Cereghetti et al., 2018). Die LCR Region ist im monomeren Cdc19 frei zugänglich, wohingegen im gebildeten Tetramer die Region verdeckt vorliegt. Die Aggregatbildung konnte nur festgestellt werden, wenn Cdc19 als Monomer vorlag. Neben Cdc19 gehört die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Tdh1-3, Abbildung 3-2 F; McAlister & Holland, 1985), die 3-Phosphoglyceratkinase (Pfk1, Abbildung 3-2 G; Holland

& Holland, 1978) sowie die Phosphopyruvat-Hydratase (auch Enolase genannt Eno1/2, Abbildung 3-2 I; Cohen et al., 1987) zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen in der Hefe. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass unter anaeroben, hoch fermentativen Bedingungen Pfk1/2, Eno2 und Cdc19 glykolytische Körper bilden (Jin et al., 2017).

Hefezellen, denen Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, besitzen eine hohe Glykolyserate (de Alteriis et al., 2018; Otterstedt et al., 2004). Der verstärkte glykolytische Fluss führt zu einer hohen Produktion von Pyruvat. Durch die Pyruvat-Decarboxylase wird Pyruvat daraufhin zu Acetaldehyd transformiert. Das Enzym besitzt eine geringere Pyruvat-Affinität und erkennt daher viel produziertes Pyruvat. Im letzten Schritt erfolgt die Produktion von Ethanol (de Alteriis et al., 2018). Bei anderen schlecht fermentierbaren Kohlenstoffquellen oder bei einer geringen Glukosekonzentration läuft der glykolytische Fluss verlangsamt ab (Huberts et al., 2012; Martinez-Ortiz et al., 2019). Dies hat zur Folge, dass weniger Zwischenprodukte produziert werden. Somit liegt Pyruvat in einer geringeren Konzentration vor. Die Pyruvat-Dehydrogenase besitzt eine hohe Affinität zum Pyruvat und erkennt somit die geringere Menge des Metabolits (de Alteriis et al., 2018). Somit erfolgt, nachdem die Glukose verbraucht wurde, eine Umprogrammierung der Zellen, die sich zunächst in dem diauxischen Wechsel befinden (Busti et al., 2010). Die Energiegewinnung läuft über die oxidative Phosphorylierung ab.

Pyruvat wird über den respiratorischen Stoffwechselweg abgebaut (Pfeiffer & Morley, 2014). Hier erfolgt der Abbau über Acetyl-Coenzym A (CoA), welches wiederum in den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA „*tricarboxylic acid*“) eingeschleust werden kann. Im TCA erfolgt unter Abspaltung von Wasserstoff die Oxidation von Acetyl-CoA zu Kohlendioxid und die Reduktionsäquivalente werden für die Atmungskette bereitgestellt (McCammon et al., 2003). An der inneren Seite der Mitochondrien liegt der Elektronen-Transport-Komplex vor (Barros & McStay, 2020; Schlegel, 2006). In diesem Superkomplex erfolgt der Elektronentransfer der Reduktionsäquivalente aus dem TCA. Innerhalb der Membran kommt es zur Weiterleitung der Elektronen, sodass Protonen gegen das Konzentrationsgefälle nach außen transportiert werden. In den Superkomplexen werden Elektronen von Co-Faktoren wie Eisen-Schwefel-Cluster transferiert, sodass sie von höheren Redox-Zuständen zu solchen mit niedrigeren weitergeleitet werden. Die Co-Faktoren sind an spezifische Untereinheiten gebunden, der Elektronenfluss ist dadurch vorgegeben ist (Barros & McStay, 2020). Der Komplex I (NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase) besteht aus 45 Untereinheiten. In der Hefe liegt der Komplex I als Polypeptid-NADH-Dehydrogenase vor. Hier können die Elektronen von NADH zu Ubichinon transferiert werden, jedoch fungiert er nicht als Protonen-Pumpe. Der Komplex II, die Succinate- Dehydrogenase, oxidiert Succinat aus dem TCA und überträgt die Elektronen auf Co-Faktoren. Der Komplex III, die Cytochrom-c-Reduktase, katalysiert den Schritt von Ubichinol zu Cytochrom c. Dieser Schritt trägt zur Bildung des elektrochemischen Gradienten bei. Der Gradient wird für die Synthese von ATP, vermittelt durch den mitochondrialen F₁-F₀-ATP-Synthase-Komplex, genutzt. Mit der Reduktion zu molekularem Sauerstoff endet der Elektronentransport. Die Cytochrom-

c-Oxidase (Komplex IV) ist hierbei der terminale Elektronenakzeptor und es erfolgt die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Die Respiration ist im Gegensatz zur Fermentation effizienter in der Energieproduktion (Futcher, 2006; Otterstedt et al., 2004). Aus 1 mol Glukose kann mehr als 30 mol ATP generiert werden, jedoch wird die Energie durch Fermentation schnell gewonnen.

Für die Energiegewinnung kann *S. cerevisiae* unterschiedliche Kohlenstoffquellen heranziehen (Turcotte et al., 2010). Solche Kohlenstoffquellen können andere Zucker wie Saccharose, Maltose oder Raffinose sein oder auch Ethanol und Glycerin. Die Kohlenstoffquellen werden durch verschiedene Stoffwechselwege verwertet. Steht den Zellen keine fermentierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung, da diese aufgebraucht wurde, kommen sie in den diauxischen Wechsel, in der sie Ethanol aerob verwerten (Galdieri et al., 2010). Dies erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird Ethanol zu Acetaldehyd oxidiert, daraufhin zu Acetat konvertiert. Im letzten Schritt erfolgt die Produktion zu Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Synthetase (Pronk et al., 1996). Acetyl-CoA kann, wie schon zuvor beschrieben in den TCA-Weg eingespeist werden.

Glukose ist durch die Aufnahme und Verstoffwechselung, ein hervorragender Energielieferant der Hefezelle. Auch wenn Sauerstoff zur Verfügung steht, erfolgt bei ausreichender Glukosekonzentration die Fermentation. Erst nachdem Glukose verbraucht wurde, fängt die Zelle an zu atmen.

3.1.2 Glukose gesteuerte Prozesse

Wie schon im vorangegangenen Abschnitt erklärt, ist die Glukosekonzentration entscheidend für die Wahl des genutzten Stoffwechselwegs zur Energiegewinnung (Barnett, 2003; Galdieri et al., 2010). Neben der Energiegewinnung des Zuckers spielen regulatorische Mechanismen, die durch Glukose induziert werden, eine entscheidende Rolle (Kim et al., 2013; Santangelo, 2006). In der Hefezelle gibt es ein Wechselspiel zwischen zwei Glukosesignalwegen. Die Aufnahme von Glukose induziert die Expression von relevanten Genen. Zusätzlich werden Gene, die für Enzyme codieren, die an der Atmung oder am Stoffwechsel alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind, durch Glukose reprimiert. Eine schematische Übersicht der Prozesse, die durch Glukose gesteuert werden, ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

Mithilfe von Sensoren kann Glukose im Medium erkannt werden (Van Ende et al., 2019). Dies sind zum einen Snf3 und Rgt2 mit 12 Transmembrandomänen (Celenza et al., 1988; Özcan et al., 1996). Ist genügend Glukose im Medium verfügbar, werden die Regulatoren Std1 und Mth1 ubiquitiniert und abgebaut (Van Ende et al., 2019). Kann keine extrazelluläre Glukose wahrgenommen werden, inhibieren die Regulatoren zusammen mit Rgt1 die Transkription von Hexose-Transportern (Özcan & Johnston, 1995). Bei geringer Glukosekonzentration wird durch Snf3 die Expression von Hexose-Transportern vermittelt, welche eine hohe Affinität zu Glukose aufweisen. Gpr1 ist ein weiterer Glukosesensor mit 7 Transmembrandomänen (Xue

et al., 1998). Analysen ergaben, dass der Rezeptor bei vorliegender Glukose mit der α -Untereinheit des heterotrimerischen G-Proteins interagiert (Gpa2) und dieses aktiviert.

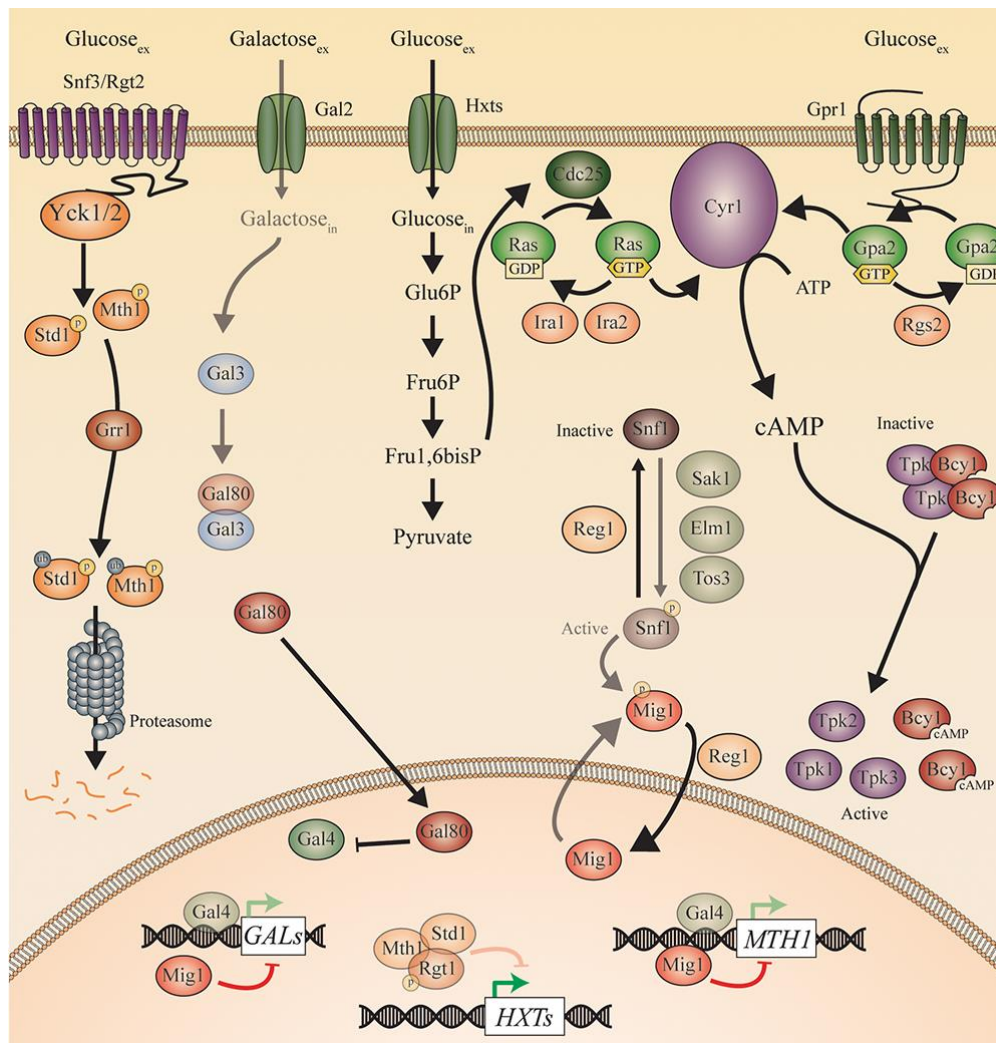


Abbildung 3-4: Erkennung und Verstoffwechselung von Glukose in *S. cerevisiae*. Die schwarzen Pfeile zeigen die Stoffwechselwege an, wenn extrazelluläre Glukose (ex) erkannt wurde. Die blassen Pfeile und Proteine beschreiben die Wege, wenn keine Glukose im Medium vorhanden ist. Grüne Pfeile stehen für die Genexpression und rote Pfeile für die Genrepression. Glukose wird durch Snf3/Rgt2 erkannt und die negativen Regulatoren Sdt1 und Mth1 durch Yck1/2 phosphoryliert, durch Grr1 ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Es erfolgt eine Expression der Hexose-Transporter (HXTs). Die HXTs werden bei Glukosemangel durch Sdt1, Mth1 und Rgt1 inhibiert. Die durch Hxt aufgenommene Glukose wird verstoffwechselt, es entsteht Pyruvat. Das Nebenprodukt Fruktose-1,6-Bisphosphat aktiviert den Guanosin triphosphat-Austauschfaktor (GEF „Guanosine triphosphate Exchange Factor“). Cdc25 ist für den Austausch von dem an Ras gebundenen GDP zu GTP verantwortlich. Durch Ira1/2 erfolgt die Inaktivierung von Ras, wodurch der Austausch rückgängig gemacht wird. Das an Ras gebundene GTP aktiviert die Adenylatcyclase (Cyr1) und cAMP wird gebildet. Auch die Interaktion des Sensor Gpr1 mit der α -Untereinheit des heterotrimerischen G-Proteins (Gpa2), welche zu einer aktiven, GTP gebundenen Form führt, hat eine erhöhte cAMP-Menge zu Folge. Rgs2 ist der negative Regulator von Gpa2. Das gebildete cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit von PKA, Bcy1, was zu einer aktiven PKA (katalytische Untereinheiten TPK1-3) führt. Gene werden durch Mig1 reprimiert, wenn Glukose im Medium vorhanden ist. Ist eine andere Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Galaktose verfügbar, wird Mig1 durch Snf1 phosphoryliert und aus dem Kern exportiert. Die für Enzyme des Galaktosestoffwechsels (GALs)-codierende Gene, können exprimiert werden. Die Kinase Snf1 liegt nach der Phosphorylierung durch Tos3, Elm1 und Sak1, aktiv vor und phosphoryliert daraufhin Mig1. Bei verfügbarer Glukose wird Snf1 durch Phosphatase Glc7-Reg1, inaktiv gehalten, Mig1 dephosphoryliert und in den Kern importiert (Abbildung Van Ende et al., 2019).

Daraufhin erfolgt eine Erhöhung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP), was durch die aktive Adenylatcyclase (Cyr1) gebildet wird (Colombo et al., 1998; Kim et al., 2013; Versele et al., 1999; Xue et al., 1998). Die erhöhte cAMP-Menge führt durch Bindung an die regulatorische Untereinheit Bcy1 zu einer PKA-Aktivierung (Toda et al., 1987). Eine erhöhte Produktion von cAMP kann außerdem durch Ras vermittelt werden, welches durch die Glykolyse aktiviert wird (Peeters et al., 2017).

Die Glukose-Aufnahme erfolgt, je nach Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle, über die Hexose-Transporter mit hoher und niedriger Affinität (Özcan & Johnston, 1995). Ist Galaktose im Medium vorhanden, kann es nicht direkt über die Glykolyse verwertet werden (Nehlin et al., 1991). Die Gene für die Verstoffwechselung von Galaktose werden durch den Snf1-Mig1-Weg reguliert und aktiviert, wenn keine Glukose zur Verfügung steht. Die durch Mig1 vermittelte Glukose-Repression, hängt von dessen Phosphorylierungsstatus ab (Devit et al., 1997; Smith et al., 1999; Treitel & Carlson, 1995). Bei genügend Glukose ist Mig1 im Kern lokalisiert und nicht phosphoryliert. Ist die Glukose aufgebraucht, erfolgt eine Phosphorylierung durch Snf1, wobei Mig1 aus dem Kern exportiert wird. Es erfolgt eine Derepression der Glukose-reprimierten, oder besser gesagt der Mig1 regulierten Gene.

Aufgrund der Komplexität der unterschiedlichen Prozesse wird in den nachfolgenden Kapiteln auf einzelne, für die Arbeit relevante Wege näher eingegangen. Hierbei stehen der Ras-cAMP-PKA und der Snf1-Mig1-Signalweg im Vordergrund.

3.1.2.1 Der Ras-cAMP-PKA-Signalweg

Einer der Hauptsignalwege in der Hefe ist der Ras-cAMP-PKA-Weg (Busti et al., 2010). Neben dem Zellwachstum reguliert dieser noch weitere Faktoren wie Proliferation, Metabolismus und Stressresistenz. Bei Betrachtung des Transkriptoms werden 90% der Transkripte nach der Zugabe von Glukose in Glycerin-Medium durch die Aktivierung der PKA reguliert (Broach, 2012). Das durch die Glykolyse entstandene Fruktose-1,6-Bisphosphat aktiviert Ras über seinen GEF-Faktor Cdc25 (Peeters et al., 2017). Die Protoonkogene *RAS1/2* codieren für GTP (Guanosin-triphosphat) bindende Proteine (Broach, 2012; Busti et al., 2010). Der GDP (Guanosin-diphosphat)-GTP-Austausch führt zur Aktivierung von Ras durch Cdc25. Wird das Phosphat durch Ira1/2 wieder abgespalten, so führt dies zur Inaktivierung von Ras. Das aktive Ras bindet an die Adenylatcyclase und steuert so die Produktion von cAMP. Das cAMP-Level wird zusätzlich durch die Degradation der Phosphodiesterasen reguliert. Die Phosphodiesterase mit niedriger Affinität wird von *PDE1* und die mit hoher Affinität von *PDE2* codiert. Die PKA ist eine Serin-Threonin-Kinase. Sie besteht aus zwei von *TPK1-3* codierten katalytischen Untereinheiten und einer regulatorischen Untereinheit, codiert von *BCY1*. Die drei Gene der katalytischen Untereinheit sind homolog und ein Gen allein ist für die PKA-Aktivität ausreichend. Wohingegen die Deletion aller drei Gene zu einem Funktionsverlust und damit einhergehender Letalität führt. In den jeweiligen Untereinheiten konnten Unterschiede in der Substratspezifität gefunden

werden (Broach, 2012; Busti et al., 2010). Die Kinase liegt, wenn sie inaktiv ist, als heterotetrameres Holoenzym vor. Die subzelluläre Lokalisation von PKA wird durch cAMP und durch die Kohlenstoffquelle reguliert. Durch die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit Bcy1 und die damit verbundene Dissoziation der regulatorischen von der katalytischen Untereinheit, erfolgt die Aktivierung der PKA. Wenn Glukose im Medium vorhanden ist, liegt Bcy1 im Nukleus akkumuliert vor, wohingegen bei Zellen die Glukose aufgebraucht haben eine Anhäufung von Bcy1 im Cytoplasma detektiert werden konnte. Die Anhäufung der regulatorischen Untereinheit im Cytoplasma führt zur PKA-Inhibierung, gefolgt von einem Wechsel des fermentativen Stoffwechselwegs zum respiratorischen. Damit ausreichend cAMP vorhanden ist, müssen die Phosphodiesterasen reguliert werden. Allerdings konnte noch kein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten PKA-Aktivität und einer Abnahme von Pde1/2 festgestellt werden (Broach, 2012).

Wie schon zu Beginn des Kapitels erwähnt, ist unter Glukose-Bedingungen die aktive PKA für eine schnelle Proliferation verantwortlich (Busti et al., 2010). Neben der Stimulation des glykolytischen Flusses wird die Atmung durch Repression atmungsspezifischer Gene inhibiert. Eine hohe Anzahl von Proteinen und Enzymen, die für den Kohlenstoff-Metabolismus verantwortlich sind, werden durch PKA reguliert. Zusätzlich werden die Transkriptionsfaktoren Msn2/4 teilweise durch PKA kontrolliert. Die Transkriptionsfaktoren sind verantwortlich für die Expression von Genen mit STRE- („*stress response element*“) Sequenzen. Bei hoher PKA-Aktivität werden die Transkriptionsfaktoren inhibiert. Durch die PKA vermittelte Phosphorylierung in der Nuklearen Lokalisationssequenz (NLS) liegt Msn2 im Cytoplasma vor und kann nicht an seine Targetgene binden. Erst nachdem keine Glukose mehr zur Verfügung steht, wird Msn2 durch die Protein-Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert und in den Kern importiert (De Wever et al., 2005; Thevelein & De Winde, 1999). Des Weiteren wurde die Proteinkinase Rim15 als PKA-Target identifiziert (Lee et al., 2013). Auch dieses Enzym wird durch Inhibierung seiner Aktivität negativ von PKA reguliert. Nach dem Verbrauch von Glukose aktiviert Rim15 durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor Hsf1. Daraufhin wird die Expression von Hsf1-Targetgenen induziert. Durch die von Rim15 vermittelte Phosphorylierung von Msn2 im Nukleus können unter Stressbedingungen die Targetgene exprimiert werden. Ein weiteres Target von PKA ist Maf1, ein negativer Regulator der RNA-Polymerase III (Ribonukleinsäure „*ribonucleic acid*“ Pol III) (Moir et al., 2006). Durch die PKA-Phosphorylierung von Maf1 wird die nukleare Akkumulation des Regulators inhibiert und somit die Transkription der Pol III Gene induziert. Bei der Regulation von Msn2/4, Rim15 sowie Maf1 ist neben PKA auch TORC1 beteiligt (Cai & Wei, 2015; Lee et al., 2013). Die Proteinkinase Sch9, die durch Tor1 aktiviert wird, wirkt als redundantes System zur PKA.

3.1.2.2 Glukose-Repression in *S. cerevisiae*

Zellen, die mit Glukose wachsen, reprimieren eine hohe Anzahl von Genen (Broach, 2012, Busti et al., 2010). Zu den reprimierten Genen gehören solche, die atmungsspezifisch sind und

auch solche Gene, die für Enzyme codieren, um alternative Kohlenstoffquellen verwerten zu können. Nach kompletter Verwertung der Glukose erfolgt ein Wechsel, sodass die zuvor unterdrückten Gene nun exprimiert werden können.

Neben dem Transkriptionsfaktor Mig1, spielt die Proteinkinase Snf1 eine wichtige Rolle in dem Repressionssignalweg (Busti et al., 2010; Rolland et al., 2002). Der Transkriptionsrepressor Mig1, ein DNA-Binde-Zinkfinger-Protein, bindet an viele Promotoren von Glukose-reprimierten Genen. Durch die Mobilisierung des Co-Repressor-Komplexes Ssn6-Tup1 an Mig1 erfolgt die Repression bestimmter Gen-Familien. Entscheidend für die Inhibierung der Genexpression ist die nukleare Lokalisation von Mig1. Ist Glukose im Medium vorhanden, liegt Mig1 dephosphoryliert im Kern vor und die Gene werden reprimiert. Neben Mig1 spielt auch Hxk2 in der Glukose-Repression eine wichtige Rolle (Moreno et al., 2005). In Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass beide Proteine miteinander interagieren. Ungefähr 15% von Hxk2 ist im Nukleus lokalisiert und etwa genauso viel Mig1 kann, Glukose abhängig, im Kern vorgefunden werden. Liegt Mig1 verstärkt im Nukleus vor, konnte eine Kernanreicherung von Hxk2 detektiert werden. Der Import des Glykolyse-Enzyms ist abhängig von Glukose und wird durch die Importine Kap60 und Kap95 vermittelt (Peláez et al., 2012). Bei ausreichender Glukosemenge werden die im Kern lokalisierten Proteine Mig1 und Hxk2 aktiv zu dem *SUC2*-Promoter rekrutiert, der daraufhin nicht abgelesen werden kann. Nach dem Verbrauch der fermentierbaren Kohlenstoffquelle im Medium, wird außerdem Snf1 phosphoryliert und in den Kern importiert (Hedbacker & Carlson, 2009). Im Kern erfolgt dann die Phosphorylierung von Mig1, welches wiederum durch Msn5 aus dem Kern exportiert wird (Peláez et al., 2012).

Snf1 ist eine AMP (Adenosinmonophosphat)-Serin-Threonin-Kinase und ist neben der Expression der Glukose-reprimierten Gene auch an weiteren zelluläre Entwicklungsprozessen beteiligt (Hedbacker & Carlson, 2009). Die Regulation erfolgt durch drei „*upstream*“-Kinasen, Tos3, Elm1 und Sak1, sowie durch die Glc7-Reg1-Proteinphosphatase. Die AMP-Kinase ist heterotrimerisch und besteht aus der katalytischen α -Untereinheit Snf1, drei alternative β -Untereinheiten Sip1/2, Gal83 und einer γ -Untereinheit Snf4. Für die Aktivierung der katalytischen Untereinheit Snf1 ist eine Phosphorylierung am Thr210 notwendig, die durch die „*upstream*“-Kinasen und Proteinphosphatase reguliert wird. Die drei β -Untereinheiten haben ähnliche Funktionen und eine Untereinheit ist für die Aktivität der Kinase ausreichend. Wenn Glukose im Medium vorhanden ist, sind alle Untereinheiten im Cytoplasma lokalisiert. Nach Glukose-Depletion ist Sip1 in der Vakuolenmembran, Gal83 im Nukleus und Sip2 weiter im Cytoplasma vorzufinden. Obwohl die Snf1-Kinase eine AMP-Kinase ist, wird sie nicht durch AMP aktiviert, jedoch steigt die Aktivität der Kinase in Abhängigkeit der AMP/ATP-Rate.

Wenn Glukose zur Verfügung steht, wird Snf1 durch die Proteinphosphatase1 dephosphoryliert und inaktiv gehalten. Nachdem Glukose verbraucht ist, erfolgt die Phosphorylierung von Snf1 durch die „*upstream*“-Kinasen. Wie genau jedoch Snf1 in Abhängigkeit von Glukose reguliert

wird, ist noch nicht aufgeklärt (Hedbacker & Carlson, 2009). Ein Modell wäre, dass das Glukose-signal die Proteinphosphatase1 Glc7-Reg1 reguliert. Hierbei ist Glc7 die katalytische und Reg1 die regulatorische Untereinheit der PP1, die bei hoher Glukosekonzentration Snf1 dephosphoryliert. In diesem Zustand liegt Snf1 im Cytoplasma vor. Die Phosphatase PP1 beeinflusst ebenfalls eine Konformationsänderung am Snf1-Komplex in Abhängigkeit von Glukose (Sanz et al., 2000). Des Weiteren ist Reg1 bei der Präsenz von Glukose an der Dephosphorylierung von Mig1 beteiligt, welches daraufhin in den Kern importiert werden kann (Shashkova et al., 2017).

In Anwesenheit einer anderen, nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle oder nach Verbrauch der Glukose liegt Glc7-Reg1 inaktiv vor, was zu mehr phosphoryliertem Snf1 und einer Lokalisation in den Nukleus führt (Hedbacker & Carlson, 2009). Unter diesen Bedingungen wird Reg1 phosphoryliert und durch Zugabe von Glukose kann dieser Zustand durch Glc7 wieder rückgängig gemacht werden (Sanz et al., 2000). Es konnte zudem gezeigt werden, dass für die Glukose-Repression Reg1 notwendig ist, da Mutationen in diesem Protein zu einer Hyperaktivierung von Snf1 führen (Zhang et al., 2011). Im Kern wird daraufhin Mig1 durch Snf1 phosphoryliert und ins Cytoplasma exportiert. Die Glukose-reprimierten Gene können infolgedessen exprimiert werden (Hedbacker & Carlson, 2009). Neben Mig1 werden noch weitere Transkriptionsfaktoren wie Cat8 und Sip4 von Snf1 reguliert. Beide binden an Gene, die für Enzyme der Gluconeogenese codieren.

Zu den Genen, die während des Wachstums mit Glukose reprimiert werden gehören auch solche, die für atmungsspezifische Enzyme codieren (Broach, 2012; Busti et al., 2010). Neben den *CYC*-Genen, die Teile der oxidativen Phosphorylierung sind, wird auch *HAP4* nachdem Glukose verbraucht wurde, verstärkt exprimiert (Bolotin-Fukuhara, 2017; Gancedo, 1998; Morgenstern et al., 2017). Das Gen codiert für die Aktivierungsdomäne des HAP-Komplexes und ist während des Wechsels vom fermentativen zum respiratorischen Wachstum stark induziert (Bolotin-Fukuhara, 2017). Dieser Komplex besteht aus vier Untereinheiten und kontrolliert nach Glukose-Depletion die Expression von atmungsspezifischen Genen. Zu den Untereinheiten gehören zum einen die DNA-Binde-Komponenten (Hap2/3/5) und die Aktivierungs-Komponente Hap4. Der HAP-Komplex bindet an das CCAAT-Motiv, welches sich in den Promotoren vieler eukaryotischer Gene befindet. Dieses Motiv kann in etwa 30% der Gene in der Region -60 bis -100 bp vor dem Transkriptionsstart gefunden werden. In *S. cerevisiae* ist das Motiv vor allem in Promotoren der Gene zu finden, die für das Cytochrom codieren (Kato, 2005; Mao & Chen, 2019; McNabb et al., 1995). In Genen, die für Enzyme codieren, die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle verwerten können, ist die CCAAT-Box ebenfalls zu finden. Die Hap2-Untereinheit besitzt eine essenzielle Kerndomäne, die für die Assemblierung und die DNA-Bindung notwendig ist (Bolotin-Fukuhara, 2017). Die Charakterisierung von Hap3 ergab ebenfalls eine DNA-Bindedomäne sowie Sequenzen, die eine Interaktion mit Hap2 ermöglichen. Des Weiteren konnten Bereiche für die Hap4-Assoziierung gefunden werden. In Hap5

konnte eine direkte DNA-Bindung beobachtet werden. Für eine funktionale DNA-Bindungsaktivität des HAP-Komplexes ist die Assoziierung von Hap5 mit den anderen Untereinheiten notwendig. Die konservierte Kerndomäne von Hap5 ist für die Bindung an die anderen Untereinheiten hinreichend, allerdings ist hier die Rekrutierung des transkriptionellen Aktivators zu dem Komplex nicht möglich. Für die Interaktion mit Hap4 ist eine zusätzliche Domäne essenziell. Sobald der Trimer-Komplex gebildet ist, kann dieser an die DNA-Bindesequenz assoziieren. Hap4 kann daraufhin über den Hap5-Rekrutierungsbereich binden. Des Weiteren besitzt das Protein eine N- und C-terminale Aktivierungsdomäne. Im Gegensatz zur Kohlenstoff abhängigen Expression von *HAP4*, werden die Untereinheiten *HAP2/3/5* konstitutiv exprimiert (Bolotin-Fukuhara, 2017). Hap4 besitzt eine Mig1-Bindestelle, was dessen Kohlenstoff regulierte Expression erklären würde (Bolotin-Fukuhara, 2017; Lundin et al., 1994). Allerdings führte eine Störung von Mig1 nicht zu einer Derepression von *HAP4* in Glukose. Weitere Transkriptionsaktivatoren wurden ebenfalls näher untersucht, jedoch konnte auch hier keine direkte Regulation gefunden werden (Bolotin-Fukuhara, 2017). Zusätzlich könnten posttranskriptionelle Regulationen eine Rolle in der Kontrolle des HAP-Komplexes spielen. So besitzt *HAP4* einen langen 5'-*Leader* mit 2 uORFs („*upstream open reading frame*“) (Bolotin-Fukuhara, 2017; Ingolia et al., 2009; Nagalakshmi et al., 2008). Eine mögliche Reinitiation der *HAP4*-uORFs und damit eine verschlechterte Initiation des *HAP4*-ORFs könnte für die Glukose abhängige Regulation verantwortlich sein. Dies wurde schon zuvor am Beispiel von *GCN4* (siehe 3.3) beobachtet. In Hefeextrakten sowie *in vivo* wurde zudem noch eine IRES („*internal ribosome entry site*“) in der *HAP4* mRNA („*messenger*“ RNA) detektiert (Bolotin-Fukuhara, 2017; Seino et al., 2005). Die Translationsinitiation würde sich bei Bedarf vom Cap-abhängigen zum IRES-abhängigen Mechanismus verschieben. Der HAP-Komplex kontrolliert neben den Genen, die für die mitochondriale Funktion notwendig sind, auch Gene der mitochondrialen Biogenese sowie Gene der Enzyme für die Gluconeogenese (Bolotin-Fukuhara, 2017). Eine Überexpression des Transkriptionsaktivators hat eine Veränderung des Stoffwechselzustands in Richtung diauxischen Wechsel zur Folge.

Die verwendete Kohlenstoffquelle hat nicht nur einen Einfluss auf den gewählten Stoffwechselweg, sondern auch auf die Wachstumsrate und auf die Translation (Ashe et al., 2000; Broach, 2012).

3.2 Zellteilung in *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe kann sowohl im haploiden als auch im diploiden Zustand vorliegen. In beiden Formen erfolgt eine mitotische Teilung, bei der durch Knospung eine größere Mutterzelle und eine kleinere, genetisch identische Tochterzelle entsteht. In Hefezellen spielt Glukose für die Zellteilung eine wichtige Rolle (Newcomb et al., 2003). Im glukosehaltigen Medium ist die Proliferation sehr schnell. Nachdem Glukose aufgebraucht wurde, verlangsamt sich das Wachs-

tum dramatisch. Die diploiden Zellen können zudem nach Nährstoffmangel eine Meiose durchlaufen, sie sporulieren (Neiman, 2005; Abbildung 3-5). Durch Glukose kann die Sporulation der diploiden Zellen inhibiert werden (Gray et al., 2008).

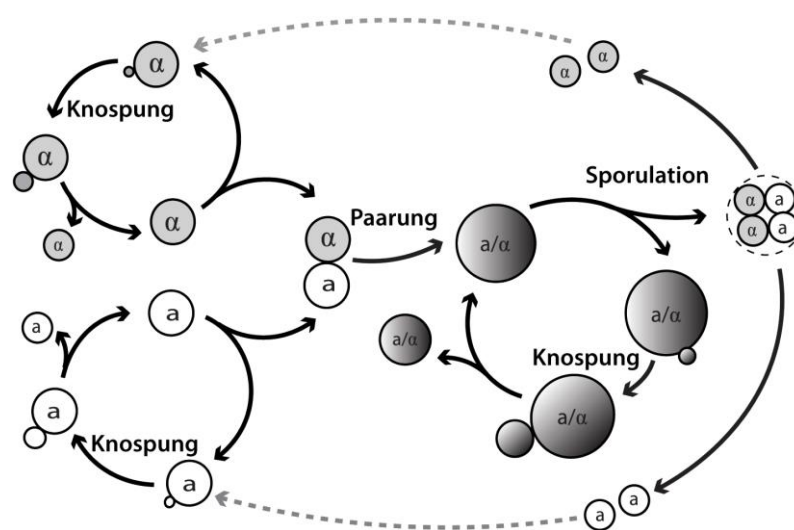


Abbildung 3-5: Lebenszyklus der Bäckerhefe. Haploide Hefezellen (Paarungstyp MAT α und MAT a) teilen sich mitotisch, wobei sich aus der Knospe die identische Tochterzelle bildet. Die a und α Zellen können sich paaren. Die daraus resultierenden diploiden Zellen teilen sich unter optimalen Wachstumsbedingungen ebenfalls mitotisch. Liegt ein Nährstoffmangel vor, erfolgt eine meiotische Teilung. Es entstehen vier haploide Nachkommen, Sporen genannt. Die Zellen bilden um die einzelnen Sporen herum einen Ascus (gestrichelte Linie). In der entstandenen Tetrade liegen 4 haploide Zellen mit unterschiedlichen Genotypen vor. Werden den Zellen wieder Nährstoffe zur Verfügung gestellt, erfolgt die Auskeimung der Tetraden und die vier haploiden Zellen (je 2 a und α) liegen frei vor. Wenn die Paarungstypen direkt voneinander getrennt werden, können sich diese entweder mitotisch teilen, oder sie paaren sich erneut und teilen sich im nächsten Schritt (Abbildung verändert nach Wang et al., 2017).

Für den Eintritt in den Zellzyklus ist Glukose ein wichtiger Faktor (Newcomb et al., 2003). Im diauxischem Wechsel verlängert sich die G1-Phase, die Zellen benötigen mehr Zeit, um in den Zellzyklus einzutreten. In den folgenden Kapiteln wird auf Ablauf und Regulation des Zellzyklus näher eingegangen.

3.2.1 Allgemeiner Ablauf des Zellzyklus in *S. cerevisiae*

In der Hefe und in anderen Eukaryoten kann der Zellzyklus in mehrere Phasen unterteilt werden (Abbildung 3-6; Morgan, 2007). Während des Zellzyklus wird das genetische Material verdoppelt und auf die Tochterzelle übertragen. Am Ende eines Zyklus erfolgt die Trennung der Tochter von der Mutterzelle, die Zytokinese.

In *S. cerevisiae* ist die Teilung, bezogen auf die Zellmasse, asymmetrisch. Die Tochterzellen sind kleiner als die Mutterzellen. Bevor sich die Zellen erneut teilen können, müssen diese zunächst heranwachsen und Proteine neu synthetisieren, bis ein bestimmter Schwellenwert erreicht ist (Jorgensen & Tyers, 2004). Dies erfolgt in der sogenannten *Gap1*-(G1) Phase. Da die Tochterzellen eine kritische Größe benötigen, brauchen sie länger, um in den Zellzyklus einzutreten. Beim START Kontrollpunkt am Ende der G1-Phase (Abbildung 3-6), kommt es zu einer Koordination von Zellwachstum und Zellzyklus (Hartwell et al., 1974). Neben der kritischen Größe

ist auch die Nährstoffverfügbarkeit ein wichtiger Faktor für den Eintritt in die Zellteilungen. Nachdem START einmal überschritten ist, läuft der gesamte Zellzyklus irreversibel ab und die Teilungsphase beginnt (Morgan, 2007). In der Synthese-Phase (S-Phase) erfolgt die DNA-Replikation. Des Weiteren bildet sich eine Knospe am Ende der G1-Phase, welche kontinuierlich in der S-Phase weiterwächst. Der Spindelpol Körper (SPK), wird verdoppelt. Von hier aus werden die mitotischen Spindeln, bestehend aus Protein-Polymeren, den Mikrotubuli, organisiert.

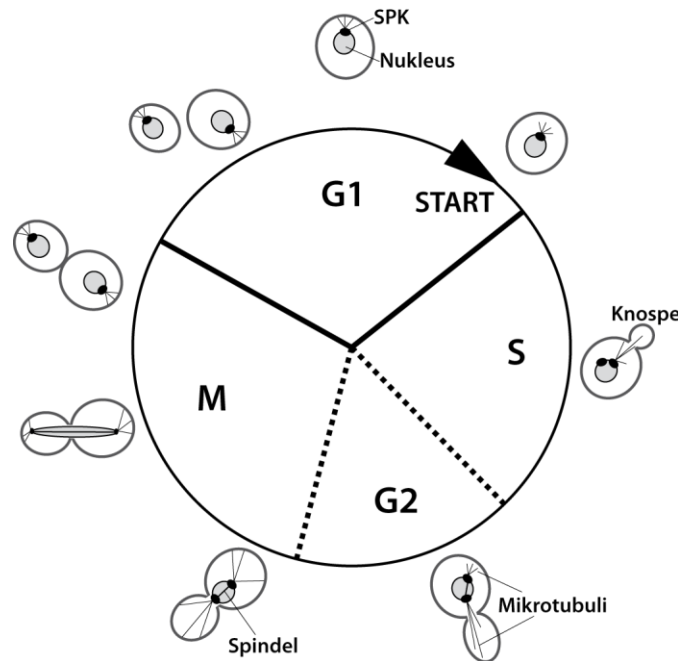


Abbildung 3-6: Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae*. Der Zellteilungszyklus besteht aus vier Phasen, G1-, S-, G2- und der M-Phase. Die G2-Phase ist in der Hefe, im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, nicht klar ausgeprägt (gestrichelte Linie). Der START am Ende der G1-Phase signalisiert den irreversiblen Eintritt in den Teilungszyklus. In der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA, die Bildung der Knospe sowie die Verdopplung des Spindelpolkörpers (SPK). Außerdem werden die mitotischen Spindeln, ausgehend von den Polen, ausgebildet. Vor dem Eintritt in die Mitose wandert der SPK an die entgegengesetzten Pole des Nukleus. In der M-Phase sind die Mitosespindel vollständig ausgebildet und die Mitose läuft ab. Hier werden die Chromosomen segregiert und zuletzt der Kern geteilt. Durch die asymmetrische Zytokinese liegen am Ende des Zyklus zwei genetisch identische, jedoch verschieden große Zellen vor. In der G1-Phase erfolgt die Vorbereitung auf den nächsten Zyklus (Abbildung verändert nach Höckner, 2016).

In der Mitose (M)-Phase, die in fünf Subphasen unterteilt ist, erfolgt eine Auftrennung der Schwester-Chromatiden, die Chromosomen werden daraufhin decondensiert (Mitchison & Salmon, 2001). Während der Zytokinese, die auf die Mitose folgt, wird eine neue Zellmembran und Zellwand am Knospenhals in *S. cerevisiae* gebildet (Cabib, 2004). Daraufhin erfolgt die Trennung beider Zellen. Diese wird durch zwei Wege vermittelt. Ein wichtiger Weg geht über den kontraktilen Acto-Myosin-Ring (Balasubramanian et al., 2004). Durch die Kontraktion des Acto-Myosin-Rings wird die Membranablagerung gesteuert. Neben der Membransynthese erfolgt auch die Synthese des Chitin haltigen Septums (Balasubramanian et al., 2004; Morgan, 2007). In der darauffolgenden G1-Phase findet das Wachstum der Zelle und die damit verbundene Vorbereitung auf einen erneuten Zellzyklus statt.

3.2.2 Regulation der G1/S-Transition in *S. cerevisiae*

Für einzellige und auch mehrzellige Organismen ist der Zellzyklus der grundlegendste Prozess. Damit dieser reibungslos und fehlerfrei ablaufen kann, werden bestimmte Kontrollmechanismen benötigt (Bertoli et al., 2013). Die allgemeinen Funktionen des regulatorischen Netzwerks sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert. In der Zellzyklus-Regulation sind mehrere Aspekte entscheidend. Am Übergang von der G1- in die S-Phase ist für die Regulation der START-Punkt in der Hefe wichtig und notwendig, um irreversibel in den Zellzyklus eintreten zu können. Hierbei müssen die Zellen zuvor eine kritische Größe erreicht haben und ihnen müssen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen. Zusätzlich gibt es einen Kontrollpunkt nach der DNA-Replikation in der S-Phase. Hier stoppen die Zellen als Reaktion auf vorhandene DNA-Schäden oder bei unvollständiger Replikation, bevor sie das Erbmateriale an die Tochterzellen in der M-Phase weitergeben. Zwischen der Meta- und Anaphase liegt ein weiterer Kontrollpunkt vor, das Spindelkontrollsystem („*spindle assembly checkpoint*“ SAC) (Clarke & Bachant, 2008). In dieser Phase ist es wichtig, dass die Schwester-Chromatiden bipolar gebunden sind und in richtiger Orientierung vorliegen.

Innerhalb der zuvor aufgeführten Kontrollpunkte regulieren unterschiedliche Faktoren die aufeinander folgenden Schritte (Hartwell & Weinert, 1989). Hierbei ist es notwendig, dass die Regulatoren in bestimmten Phasen in aktiver Form vorliegen. Die Aktivität der Regulatoren in den jeweiligen Zellzyklus-Phasen wird durch spezifische Expression und über posttranslationale Modifikationen gesteuert. Die Identifizierung einer hohen Anzahl von Zellzyklus („*cell division cycle*“, CDC)-Genen in *S. cerevisiae* war Hartwell und Kollegen durch Mutationsanalysen in temperatursensitiven Hefestämmen möglich (Hartwell et al., 1970). Diese Gene sind für den Zellzyklus notwendig, da ihre Produkte entscheidend für den Zellzyklusfortschritt in unterschiedlichen Phasen sind.

Eine essenzielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen cyclinabhängige Kinasen („*cyclin dependent kinase*“, Cdk) (Malumbres, 2014). Sie regulieren unter anderem die Transkription in Abhängigkeit von intra- und extrazellulären Signalen. Durch die Modifikation ihrer Targets können einzelne Phasen des Zyklus eingeleitet werden (Morgan, 2007). In der Bäckerhefe sind sechs Cdk konserviert, wobei Cdk1, codiert durch *CDC28*, notwendig und ausreichend ist, um den Zellzyklus zu steuern (Enserink & Kolodner, 2010). Die Targets von Cdk1 kontrollieren neben der DNA-Replikation bzw. Segregation, Transkriptionsprogramme und Zellmorphogenese (Bloom & Cross, 2007; Enserink & Kolodner, 2010). Die Serin-Threonin-Kinase, die vorzugsweise die Konsensussequenz S/T-P-X-K/R phosphoryliert, hat etwa 75 Targets. Die Cdk-Funktion, Aktivität und Substratspezifität, ist von der Bindung der aktivierenden und regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, abhängig. Die Bindung einer regulatorischen Untereinheit führt zu einer starken Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Kinasen (Jeffrey et al., 1995). Neben den Cyclinen ist auch die Phosphorylierung von Cdk1 durch CDK-aktivierende Kinasen („*Cdk activating kinase*“, Cak) für die Aktivität erforderlich. Cak1 phosphoryliert Cdk1 an

der Stelle T169, wodurch vermutlich die Substratbinderegion offen liegt und die Cycline an die Cdk1 binden können (Enserink & Kolodner, 2010). Cyclinabhängige Kinase-Inhibitoren („*cyclin-dependent kinase inhibitors*“, Cki) binden an die Cyclin-Cdk-Komplexe und inhibieren so ihre Aktivität. Während des Zellzyklus sind Cycline in manchen Phasen präsent, in anderen sind sie abwesend (Kõivomägi & Loog, 2011). Dieses periodische Auftreten ist die treibende Kraft im Voranschreiten des Zyklus.

In *S. cerevisiae* sind die Cycline Cln1-3 ausschlaggebend für den G1/S-Übergang, wobei die B-Typ-Cycline (Clb5-6) die S-Phase regulieren. Clb3-4 sind verantwortlich für frühe mitotische Ereignisse und Clb1-2 schließen die Mitose ab. Die schwankende Cyclin-Konzentration hängt zum einen an der Zellzyklus regulierten Transkription und zum anderen an der Degradation durch die von Ubiquitin vermittelten Proteolyse (Teixeira & Reed, 2013). Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es für die Degradation von Zellzyklus-Proteinen verantwortlich ist. Die zwei E3-Ubiquitin-Ligasen (Skp/cullin/F-box-Protein, SCF und „*anaphase-promoting complex/cyclosome*“, APC/C) führen diese Funktion aus. Der Unterschied zwischen beiden liegt in der Substratspezifität und in der Regulation ihrer Aktivität begründet. Der APC/C ist hauptsächlich in der Mitose und in der G1-Phase aktiv (Vodermaier, 2004). Der SCF-Komplex ist vielseitiger und erfüllt in vielen Zellzyklus-Phasen unterschiedliche Funktionen. Der SCF-Komplex besitzt drei Komponenten, in der Bäckerhefe sind es Skp1, Cdc53 und Rbx1 (Feldman et al., 1997; Wei & Sun, 2010). Wobei Rbx1 die Ringfinger-Komponente und Cdc53 das Strukturprotein des SCF-Komplexes bildet. Skp1 interagiert mit der Cullin-Untereinheit Cdc53 und bindet eins von vielen F-Box Proteinen, wie Cdc4 oder Grr1 (Cardozo & Pagano, 2004). Ein Target des SCF^{Cdc4}-Komplex ist der Cki, Sic1, und von SCF^{Grr1} sind es die Cycline Cln1-2 (Cardozo & Pagano, 2004; Teixeira & Reed, 2013).

Während des G1/S-Übergangs erfolgt eine transkriptionelle Regulation unterschiedlicher Cycline (Abbildung 3-7; Bertoli et al., 2013). In der G1-Phase ist die Konzentration der Cycline zunächst niedrig, was folglich zu einer geringeren Cdk1-Aktivität führt. Dies liegt zum einem an dem APC^{Cdh1}-Komplex, der die B-Cycline am Ende der Mitose abbaut und zum anderen an der geringeren Cyclin-Expression (Sivakumar & Gorbisky, 2015). Während der G1-Phase liegt Cln3 als einziges Cyclin akkumuliert und auf einem konstanten Level in der Zelle vor (Aldea et al., 2007). Cln3 bindet an Cdk, was zur Aktivierung von START und damit zum irreversiblen Eintritt in den Zellzyklus führt (Bertoli et al., 2013; Litsios et al., 2019). Hierbei werden die Transkriptionsfaktor-Komplexe SBF (SCB „*binding factor*“) und MBF (MCB „*binding factor*“) aktiviert, indem der Inhibitor Whi5 durch den Cdk-Komplex phosphoryliert wird. Der SBF-Komplex besteht aus der DNA-Binde-Komponente Swi4 und dem Transkriptionscofaktor Swi6. Durch diese Derepression können die Cycline Cln1-2 exprimiert werden. Der MBF-Komplex besteht neben Swi6 noch aus der DNA-Binde-Komponente Mbp1. Dieser Komplex ist für die Expression der S-Phasen spezifischen Cycline Clb5-6 notwendig. Die Akkumulation von Cln1-2, gefolgt von der Cdk Bindung führt zur Aufrechterhaltung der Whi5-Phosphorylierung und fördert

die G1/S-Transition (Abbildung 3-7 A). Beide Cycline leiten sowohl die Knospenbildung als auch die Duplikation des Spindelpolkörpers ein (Jaspersen et al., 2004; Lew & Reed, 1993). Cln1-2 im Komplex mit Cdk1 initiiert den Abbau des Cdk-Inhibitors, Sic1 (Bertoli et al., 2013; Teixeira & Reed, 2013). Dies erfolgt durch den SCF^{cdc4}-Komplex.

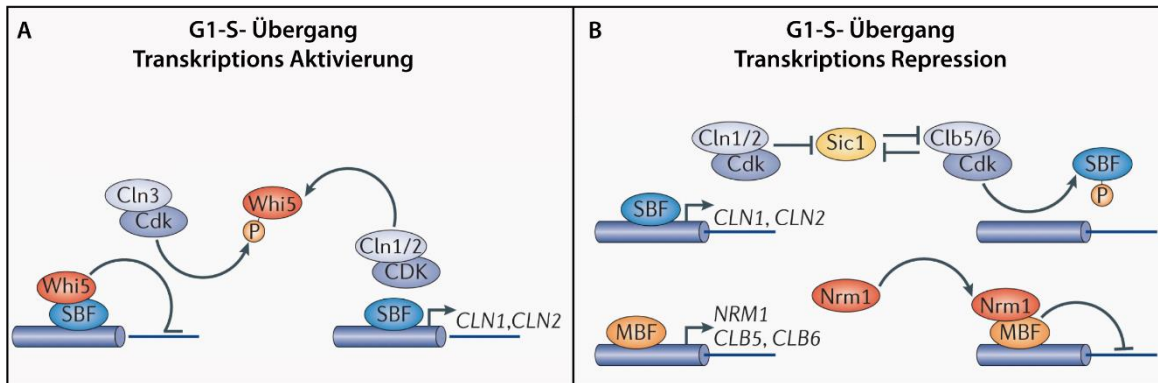


Abbildung 3-7: Transkriptionskontrolle während dem G1/S-Übergang. **A**, Positive Rückkopplungsschleife: In der G1-Phase bindet Whi5 an den SBF-Komplex (SCB „binding factor“). Nach dem START überschritten ist, bindet Cln3 an Cdk was zur Phosphorylierung von Whi5, gleichzeitiger Aktivierung von SBF und zur Expression von Cln1-2 führt. Cdk/Cln1-2 phosphorylieren ebenfalls Whi5. **B**, Negative Rückkopplungsschleife: Oben, Repression der Transkriptionsaktivatoren. Cdk/Cln1-2 sind an der Degradation von Sic1, einem Cdk Inhibitor, beteiligt. Dadurch werden die S-Phasen-Cycline Clb5-6 nicht abgebaut. Diese sind wiederum durch eine vermittelte Phosphorylierung an der Dissoziation des SBF-Komplexes von den Promotoren beteiligt. Unten, Transkriptionsrepression. Der Repressorkomplex MBF (MCB „binding factor“) bindet dauerhaft an die Cyclin-Promotoren. Durch die Bindung des Co-Repressors Nmr1 reprimiert der Komplex die Expression der Cycline, die für den G1/S-Übergang notwendig sind (Abbildung verändert nach Bertoli et al., 2013).

Die S-Phasen spezifischen Cycline Clb5-6 aktivieren die DNA-Replikation (Bertoli et al., 2013). In der S-Phase erfolgt daraufhin die Repression der Transkriptionsaktivatoren, indem Cdk/Clb5-6 den SBF-Komplex phosphoryliert und dieser von den Promotoren dissoziiert. (Abbildung 3-7 B, oben). Der Repressorkomplex MBF ist notwendig, um die Transkription von Genen zu inhibieren, die außerhalb der G1-Phase sind. Während des gesamten Zellzyklus ist MBF an den Promotoren der reprimierten Gene gebunden. Nmr1 ist der Co-Repressor von MBF, dieser ist in der frühen G1-Phase in geringen Mengen vorhanden. In der Mitose erfolgt der Abbau von Nmr1 durch den APC/C-Komplex. Eine Akkumulation von Nmr1 erfolgt während der G1-Phase. Nmr1 bindet daraufhin an den MBF-Komplex und inhibiert dadurch die G1/S-Transkription in der S-Phase (Abbildung 3-7 B, unten). Am Ende der S-Phase und zum Übergang in die Mitose, nach dem Cln1-2-Peak, erfolgt die Akkumulation der M-Cycline Clb3-4 (Mendenhall & Hodge, 1998; Richardson et al., 1992). Der Austritt aus der Mitose beginnt mit der Schwester-Chromatiden-Segregation (Enserink & Kolodner, 2010). Der APC^{Cdc20}-Komplex ist für den Abbau der M-Cycline vor allem Clb2 verantwortlich, welches wiederum zu einer verringerten Cdk-Aktivität führt. Durch die verstärkte Expression des Cdk Inhibitors Sic1 wird die Cdk-Aktivität zusätzlich inhibiert. Die Cdc14-Phosphatase wird aus dem Nukleolus freigesetzt und dephosphoryliert die Cdk-Targets. Dies erfolgt über den FEAR-Signalweg („*Cdc fourteen early anaphase release*“). Durch die Aktivierung von MEN (*mitotic exit network*) wird die

Aktivität der Phosphatase gefördert. Der Abbau der Cycline, die Inhibierung der Cdks sowie die Dephosphorylierung der Targets führt zu einer Wiederherstellung des G1-Ausgangszustandes (Enserink & Kolodner, 2010; Wurzenberger & Gerlich, 2011). Der Zellzyklus kann nach Aufbau der Reserven erneut starten (Amodeo & Skotheim, 2016; Jorgensen & Tyers, 2004).

Wie schon zu Beginn beschrieben kann Glukose eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen (Newcomb et al., 2003). So beeinflussen Nährstoffe den Übergang von G1- in die S-Phase. Steht den Zellen zu wenig Glukose zur Verfügung, verharren die Zellen in G1. Es wurde beschrieben, dass durch den Glukosestoffwechsel ein Signal erzeugt wird, welches für die Expression von *CLN3* und *CDC28* verantwortlich ist. Durch die Verminderung des glykolytischen Flusses konnte von beiden Genen weniger Transkript detektiert werden. Der globale Repressor, codiert von *XBP1*, spielt in der G1/S Transition ebenfalls eine wichtige Rolle (Miles et al., 2013). Liegt den Zellen keine Glukose vor, wird *XBP1* verstärkt exprimiert. Xbp1 reprimiert die G1-Cycline, vor allem *CLN3*, was wiederum zu einer Verzögerung des Zellzykluseintritts führt (Mai & Breeden, 1997; Miles et al., 2013). Auch die PKA hat einen Einfluss auf den Zellzyklus. Die PKA wird ebenfalls von Glukose aktiviert (vgl. 3.1.2.1). Dies führt zu einer erhöhten Wachstumsrate und verstärkter Zellzyklusprogression (Busti et al., 2010). Ein G1-Arrest konnte nach der Inaktivierung der PKA detektiert werden. Die Zellen treten daraufhin in die ruhende Phase (G_0) ein. Wie genau die Glukose jedoch den G1/S-Übergang steuert, ist im Detail noch nicht genau verstanden (Busti et al., 2010).

Für einen Wiedereintritt der Zellen in den Zyklus, müssen sie nicht nur eine bestimmte Größe erreicht haben, sondern auch genügend Proteine aufweisen, um einen gewissen Schwellenwert zu erzielen (Polymenis & Aramayo, 2015).

3.3 Translation

Für die Zellproliferation und das Zellwachstum ist die Proteinbiosynthese die Grundlage und deshalb notwendig (Polymenis & Aramayo, 2015). Für die Zelle ist die Translation einer der energetisch anspruchsvollsten Prozesse (Lee & Tu, 2017). Für eine schnelle Proliferation benötigen die Zelle daher eine effiziente Proteinbiosynthese. Liegt den Zellen Glukose vor, können sie viele Proteine in kürzester Zeit translatieren, um eine schnelle Wachstumsrate zu unterstützen. Während der G1-Phase konnte zudem gezeigt werden, dass bei hohem glykolytischen Fluss die Translation von *CLN3* pulsartig ist und während der G1-Phase proportional stärker als die Zellgröße ansteigt (Litsios et al., 2019). Durch die verstärkte Cln3-Proteinproduktion wird der G1/S-Übergang initiiert. Sobald die Zellen die Glukose verbraucht haben, erfolgt innerhalb von Minuten eine Reduktion der globalen Translation (Ashe et al., 2000; Holmes et al., 2004). Zudem konnte eine verstärkte Translation von mRNAs, die in ihrer 5'-Region einen niedrigeren GC-Gehalt aufweisen, gezeigt werden (Castelli et al., 2011). Um die Translation aufrecht zu erhalten, benötigen die Zelle mehr als 0,5% Glukose im Medium. Es wird angenommen, dass

die Proteinbiosynthese unter diesen Bedingungen schon runtergefahren wird, jedoch noch ausreichend Glukose vorhanden ist, um einen weiteren Zellteilungszyklus durchlaufen zu können. So können sich die Zellen auf eine Verschiebung des Metabolismus, in Richtung Atmung, vorbereiten.

Die Translation lässt sich in 3 Phasen gliedern, die Initiation, die Elongation und die Termination (Gebauer & Hentze, 2004). Während der Initiation lagern sich Ribosom, die Initiator-transfer RNA ($tRNA_i^{Met}$) und weitere Faktoren an die mRNA, scannen diese und nach Erreichen des Startcodons (AUG) beginnt die Translationselongation. Während der Elongation findet die Verlängerung der Aminosäurenkette statt. Hierbei binden die Anticodons der tRNA an die Codons der mRNA. Mithilfe der Ribosomen und den Peptidyltransferasen wird die Polypeptidkette synthetisiert. Ist der vordere Teil der mRNA nicht mehr durch den Komplex besetzt, kann eine neue Initiation erfolgen. Dieser Vorgang läuft parallel ab, weshalb mehrere Ribosomen in Form von Polysomen auf einer mRNA vorgefunden werden können (Von Der Haar, 2012). Die Anzahl der Ribosomen hängt von der Länge der zu translatierenden mRNA ab (Shah et al., 2013). Im Mittel kann nach je 180 Basen ein Ribosom vorgefunden werden. Wird das Stopcodon erreicht, erfolgt die Termination. Hier wird die Polypeptidkette freigesetzt und die an der mRNA gebundenen Faktoren dissoziieren. In der Translation ist die Initiation der komplizierteste Schritt, da neben den Ribosomen und der $tRNA_i^{Met}$, 11 Initiationsfaktoren (eIF eukaryotischer Initiation-Faktor) benötigt werden (Dever et al., 2016).

3.3.1 Translationsinitiation

Die Translationsinitiation kann in mehrere Schritte untergliedert werden (Abbildung 3-8; Aitken & Lorsch, 2012). Zunächst muss der ternäre Komplex (TK) bestehend aus eIF2-GTP und $tRNA_i^{Met}$ gebildet werden (Abbildung 3-8, 1). Die $tRNA_i^{Met}$ bindet eIF2-GTP mit einer höheren Affinität als eIF2-GDP. eIF2 besteht aus 3 Untereinheiten (α , β und γ), wobei das GTP an eIF2 γ gebunden hat. Die Initiationsfaktoren eIF1, 1A, 3 und 5, sowie der TK binden an die kleine ribosomale Untereinheit (40S). Diese Faktoren formieren den 43S-Präinitiationskomplex (PIK). Innerhalb des PIKs wird durch die Interaktion der N-terminalen Bereiche von eIF1A, eIF2 und eIF3, der TK stabilisiert (Alone & Dever, 2006; Das et al., 2001). Die N-terminale Domäne von eIF5 interagiert mit eIF2 γ und die C-terminale Domäne mit eIF2 β . In der Bäckerhefe werden eIF1, 3 und 5 sowie der TK durch die Interaktionen zu einem Multifaktorkomplex (MFK) verbunden (Hinnebusch, 2011). Es wurde beschrieben, dass diese Interaktionen zu einer Bildungs- oder Stabilitätsverbesserung des 43S-PIK führen. Die Bindung von eIF1 und eIF1A an die 40S ribosomale Untereinheit führen zu einer Konformationsänderung des 43S-PIK. (Aitken & Lorsch, 2012). Sobald der PIK in einer offenen Konformation vorliegt, kann die zuvor modifizierte mRNA rekrutiert und gescannt werden (Abbildung 3-8, 3a). Die mRNA besitzt neben ihrer 5'-Cap-Struktur einen PolyA-Schwanz am 3'-Ende (Aitken & Lorsch, 2012; Jackson et al., 2010). Die 5'-Cap-Struktur wird von eIF4E erkannt und gebunden. Zu dem eIF4-Komplex gehören noch das Gerüstprotein eIF4G und die ATP abhängige RNA-Helikase eIF4A. Die

RNA-Helikase kann in Assoziation mit eIF4B die Sekundärstruktur der RNA auflösen, woraufhin der PIK binden kann. Am PolyA-Schwanz ist das PABP (PolyA-bindendes Protein, in der Hefe Pab1) assoziiert und ermöglicht dort durch Interaktion mit eIF4G und eIF4E eine Zusammenlagerung der beiden mRNA-Enden. Diese aktivierte mRNA (geschlossene und mit Proteinen gebundene mRNP „*messenger ribonucleoprotein*“) interagiert mit dem PIK und der Scanningprozess kann gestartet werden (Abbildung 3-8, 3b).

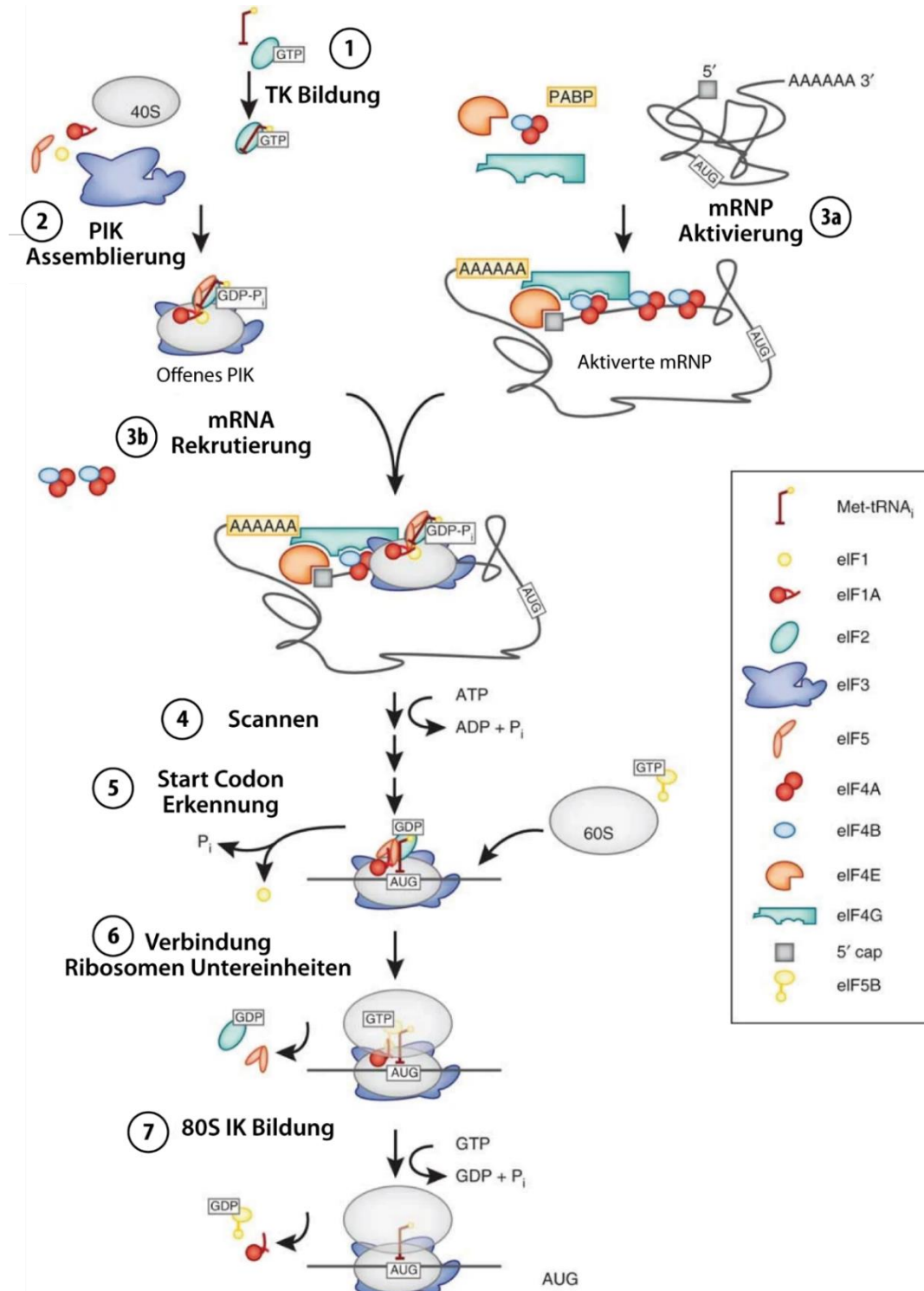


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der Translationsinitiation in Eukaryoten. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

1, Bildung des ternären Komplexes (TK) bestehend aus eIF2-GTP und der Initiator tRNA $tRNA_i^{Met}$. **2**, Der Präinitiationskomplex (PIK) bildet sich aus den Initiationsfaktoren eIF1, 1A, 3 und 5. Konformationsänderungen führen zu einem offenen PIK. **3a**, An die mRNA binden eIF4 Faktoren sowie PABP (PolyA-bindendes Protein) um die mRNA zu aktivieren (mRNP „*messenger ribonucleoprotein*“). **3b**, mRNP wird durch den offenen PIK rekrutiert. **4**, Die aktive mRNA wird durch den PIK in 5'→3' Richtung gescannt, wobei ATP entweder für die Auflösung der Sekundärstruktur oder für die Wanderung der Ribosomen verbraucht wird. **5**, Nachdem das Startcodon AUG erkannt wurde, erfolgt die Dissoziation von eIF1 und die Freisetzung von Phosphat, was zu eIF2-GDP führt. **6**, Die 60S-Untereinheit und eIF5B-GTP binden an den Komplex, während weitere Initiationsfaktoren (eIF2, eIF5) dissoziieren. **7**, Nach der GTP-Hydrolyse von eIF5B und der Abspaltung von eIF1A und eIF5B, erfolgt die Bildung des 80S-Initiationsfaktor-Komplexes (IK), die Translationselongation kann ablaufen (Abbildung verändert nach Aitken & Lorsch, 2012).

Aufgrund der zirkulären mRNP ist es möglich, dass nach Termination die mRNA für eine neue Initiationsrunde wiederverwendet werden kann. Durch die Interaktion von eIF4G mit eIF3 in Säugern, wird die aktivierte mRNP an den PIK rekrutiert. In der Hefe konnte diese Interaktion nicht gefunden werden. Stattdessen interagiert eIF5 mit eIF3 und eIF4 und verbindet so die aktivierte mRNP mit dem PIK (Aitken & Lorsch, 2012). Nachdem das offene PIK an die mRNP gebunden hat, erfolgt der Scanningprozess bis hin zur Erkennung des Startcodons (Abbildung 3-8, 4). Während des Prozesses muss zum einen die mRNA entwunden werden und sich zum anderen die Ribosomen entlang der RNA in Richtung 3'-Ende bewegen (Jackson et al., 2010). Das Startcodon besteht in der Regel aus dem AUG-Triplet in einem optimalen Kontext, der Kozak-Sequenz (GCC(A/G)CCAUGG) (Kozak, 2005). In der Hefe ist die 5'-*Leader* Region tendenziell mit vielen Adenins besetzt, vor allen in den Positionen -1 bis -30. Außerdem ist an der Position -3 ebenfalls ein Adenin (Hinnebusch, 2011). Eine vergleichbare Anordnung ist bei Säugern feststellbar (Hinnebusch, 2011). Die α - Untereinheiten von eIF2 interagiert direkt mit den umliegenden Nukleotiden des Startcodons (Hinnebusch, 2017). Ein AUG-Codon in einem schlechten Kontext kann mithilfe von eIF1 durch den 43S-PIK von einem nicht AUG-Triplet unterschieden werden (Jackson et al., 2010). Durch die korrekte Basenpaarung der $tRNA_i^{Met}$ mit dem AUG, wird ein geschlossener, blockierter Scanning-Zustand eingeleitet (Abbildung 3-8, 5). Hierbei dissoziiert eIF1 und die GTP-Hydrolyse von eIF2, mit anschließender Phosphat-(P_i) Freisetzung, findet statt. Dieser Schritt wird durch die GTPase-Aktivität von eIF5 vermittelt (Jackson et al., 2010). Durch die Hydrolyse von GTP wird die Affinität von eIF2 zur $tRNA_i^{Met}$ verringert, was zu einer Dissoziation von eIF2 führt. Die Abspaltung von eIF1, eIF1A und eIF3 sowie die Anlagerung der 60S-Untereinheit wird durch eine Ribosomen abhängige GTPase, eIF5B vermittelt (Abbildung 3-8, 6). Nachdem das eIF5B gebundene GTP hydrolysiert vorlag und der Faktor daraufhin dissoziiert, bildete sich der 80S-Initiationskomplex (IK) und die Translationselongation findet statt (Abbildung 3-8, 7).

Neben der hier beschriebenen Cap abhängigen Translationsinitiation in Eukaryoten gibt es weitere Möglichkeiten, wie die Proteinbiosynthese eingeleitet werden kann (Gebauer & Hentze, 2004). So wird zum Beispiel beim „*Leaky Scanning*“ ein AUG-Startcodon in einem schlechten Kontext nicht erkannt und von den Ribosomen überlesen (Meijer & Thomas, 2002). Liegt das Startcodon im Leserahmen vor einem zweiten Startcodon, ohne dass dazwischen ein Stopcodon

vorhanden ist, kann die Initiation mit einer gewissen Häufigkeit an beiden Codons starten. In diesem Fall treten unterschiedliche Isoformen des Proteins in Erscheinung (Hinnebusch et al., 2016). Würden zwei AUGs nicht im selben Leserahmen liegen, können unterschiedliche Proteine translatiert werden (Kozak, 2002). Folgt einem Startcodon ein nahegelegenes Stopcodon (uORF), können die Initiationsfaktoren am Komplex gehalten und eine Reinitiation der codierenden Region ermöglicht werden (Young & Wek, 2016). Ribosomen können jedoch auch nach dem uORF dissoziieren und es kommt zu keiner Translation der codierenden Region. Der Abstand zwischen dem Stopcodon des uORFs und der codierenden Region ist entscheidend für eine Reinitiation. Je größer der Abstand ist, desto mehr Zeit steht für die Bildung des 43S-PIK zur Verfügung. Die 40S-Untereinheit bleibt an der mRNA gebunden und wandert Richtung Startcodon. Ist ausreichend TK vorhanden, kann dieser binden und es kommt zur Translationsinitiation.

Die schon zuvor erwähnte IRES vermittelte Translationsinitiation (vgl. 3.1.2.2), ist unabhängig von der 5'-Cap-Struktur (Holcik & Sonenberg, 2005; Jackson et al., 2010; Seino et al., 2005). Innerhalb der mRNA-Struktur können die 40S-Ribosomen rekrutiert werden. Die mRNAs von Picornaviren, an denen die IRES vermittelte Initiation ursprünglich entdeckt wurde, besitzen keine Cap-Struktur (Holcik & Sonenberg, 2005). Von den vier identifizierten Subklassen zeigt eine davon eine Resistenz gegen zelluläre Regulationsmechanismen (eIF2 α -Phosphorylierung, siehe. 3.3.3). In allen vier Klassen ist außerdem eIF4E für die Initiation nicht notwendig, da die 5'-Cap-Struktur nicht erkannt werden muss (Jackson et al., 2010). Viele zelluläre mRNAs, die eine IRES besitzen, sind für das Zellwachstum, -Proliferation sowie der Differenzierung wichtig (Holcik & Sonenberg, 2005). Sie werden häufig in mRNAs mit langen 5'-*Leader* gefunden, die unter physiologischen Bedingungen schlecht translatiert werden. In der Hefe konnten *in vitro* Experimente verdeutlichen, dass während der durch Glukose-vermittelten Repression von Genen, die *HAP4*-Translation Cap abhängig abläuft (Seino et al., 2005). Nach der Glukose-Derepression konnte eine Verschiebung zur IRES-vermittelten Initiation beobachtet werden. Somit ist es möglich eine große Menge von Hap4 durch die IRES-vermittelte Translation zu erhalten.

In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen verfügbarer Glukose und Translation untersucht (Ashe et al., 2000; Castelli et al., 2011; Holmes et al., 2004). Vor allem ist die Translationsinitiation von der Glukose-Abwesenheit betroffen. Es wurde gefunden, dass das Level des eIF4G-eIF4A-Komplexes, nachdem Glukose aufgebraucht vorlag, deutlich reduziert war. RNA-Helikase eIF4A geht aus dem Komplex verloren, wodurch es vermutlich zum Stillstand des Initiationsprozesses kommt (Castelli et al., 2011). Die Translationsinitiation ist somit ein wichtiger Faktor, um auf die Abwesenheit von Glukose reagieren zu können. Die beschriebenen Modelle müssen jedoch noch weiter analysiert werden.

3.3.2 Translationsinitiationsfaktor eIF2

In der Translationsinitiation spielt eIF2 eine entscheidende Rolle (Aitken & Lorsch, 2012). Der Initiationsfaktor liefert die $tRNA_i^{Met}$ an das Ribosom bzw. an die zu translatierende mRNA. Der heterotrimere Proteinkomplex eIF2 besteht aus drei Untereinheiten, α , β und γ , wobei die γ -Untereinheit zu den GTPasen gehört (Vetter & Wittinghofer, 2001). In *S. cerevisiae* werden diese durch die Gene *SUI2*, *SUI3* und *GCD11* codiert. Der eukaryotische Initiationsfaktor 2 ist konserviert und Homologe treten von Menschen bis zu Archaeen (aIF2) auf (Schmitt et al., 2010). In der Hefe sind alle drei Untereinheiten essenziell für die Zellebensfähigkeit. Der Initiationsfaktor bindet GTP und am Ende der Translationsinitiation erfolgt die GTP-Hydrolyse durch das GAP-Protein (GTPase aktivierendes Protein „*activating protein*“) eIF5. Die Affinität von eIF2-GDP zu $tRNA_i^{Met}$ liegt reduziert vor, gefolgt von der Dissoziation. Durch seinen GEF, eIF2B, wird der GDP-GTP Austausch hydrolysiert, der Initiationsfaktor kann erneut den TK bilden und eine neue Runde der Translation wird eingeleitet.

Die Untereinheiten des Faktors wurden in den Archaeen näher untersucht und charakterisiert. So besteht die γ -Untereinheit aus drei Domänen, der N-terminalen G-Domäne (DI) und aus den kleineren β -Fass-Domänen II und III (Schmitt et al., 2010). Die γ -Untereinheit ist der zentrale Teil des gesamten Komplexes und bindet neben dem GTP auch die $tRNA_i^{Met}$. In Archaeen konnte außerdem gezeigt werden, dass α und β an eIF2 γ , aber nicht untereinander binden (Schmitt et al., 2002). Diese Daten werden auch durch die neusten Cryo-Elektronenmikroskopie Aufnahmen bestätigt (Gordiyenko et al., 2019). Domäne I von eIF2 γ besteht aus einem β -Faltblatt, umgeben von α -Helices und enthält die GTP-Bindetasche (Schmitt et al., 2010). Die eIF2 β -Untereinheit besitzt eine Lysin-reiche N-terminale Domäne, die in der Bindung zu eIF5 und eIF2B eine Rolle spielt. Dieser Teil ist jedoch nur in Eukaryoten konserviert. Die Kerndomäne der Untereinheit beinhaltet eine α -Helix, eine zentrale α - β -Domäne und eine C-terminale Zinkbinde-Domäne, welche für die Interaktion mit eIF2 γ wichtig ist (Schmitt et al., 2010; Thompson et al., 2000). Die Struktur der α -Untereinheit ist in Eukaryoten und Archaeen weitestgehend konserviert. Die Untereinheit hat 3 Domänen mit einem mobilen (DIII) und einem starren Bereich (DI und DII). Innerhalb der DI befindet sich das Serin 51, welches ein Target von vielen Kinasen darstellt. Dieser Rest spielt daher vor allem für die Regulation der Translationsinitiation unter Stressbedingungen eine entscheidende Rolle (siehe 3.3.3; Schmitt et al., 2010).

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass eIF2 für eine effiziente Assemblierung Cdc123 benötigt (Perzlsmaier et al., 2013). Wie schon zuvor erwähnt, konnte eine hohe Anzahl von *CDC*-Genen in temperatursensitiven Hefe Stämmen identifiziert werden (vgl. 3.2.2, Hartwell et al., 1970). Erste Untersuchungen von *CDC123* wurden an einer temperaturempfindlichen Ratten-Fibroblasten-Zelllinie durchgeführt. Diese Zellen blockieren bei restriktiver Temperatur den G1/S-Übergang (Ohno & Kimura, 1984). Okuda und Kimura ordneten diese Mutation einem nicht charakterisierten Gen zu und nannten es *D123* (Okuda & Kimura, 1996). Das homologe

Gen in *S. cerevisiae*, *CDC123*, ist hoch konserviert und zeigt Homologien in anderen Spezies, wie z. B. Eukaryoten einschließlich dem *Homo sapiens*. Der blockierte, zuvor in Ratten-Fibroblasten beschriebene G1/S-Übergang, konnte auch in der Hefe gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). Die Analyse der Cdc123-Struktur zeigt, dass das Protein zur Superfamilie der ATP-Grasp gehört und direkt an eIF2 γ bindet (Panvert et al., 2015; Abbildung 3-9). Mutationen von *CDC123* reduzieren den Zusammenbau der eIF2-Untereinheiten, was zu einer Abnahme der globalen Translation führt (Perzlsmaier et al., 2013).

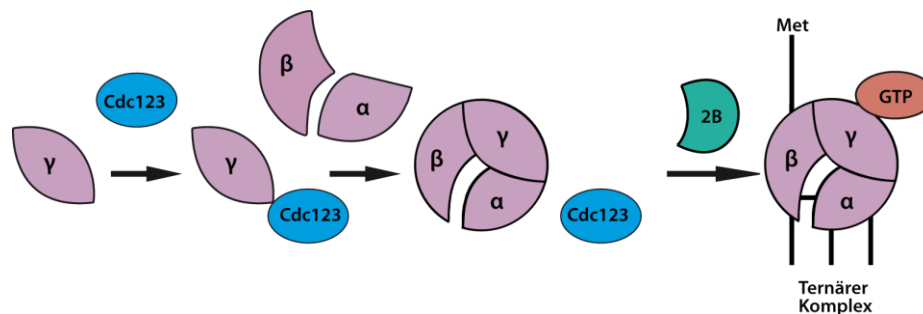


Abbildung 3-9: Modell der eIF2-Assemblierung durch Cdc123. Cdc123 bindet an die Domäne III von eIF2 γ , wodurch die Assemblierung von eIF2 α und eIF2 β gefördert wird. Diese Untereinheiten binden an die Domänen I (β) und II (α) von eIF2 γ . Cdc123 dissoziiert, der heterotrimere Proteinkomplex liegt vollständig vor und kann für die Translationsinitiation eingesetzt werden (Domänen nicht gezeigt). Durch eIF2B (grün) der GEF-Faktor von eIF2, erfolgt dessen Aktivierung, wobei GTP (orange) an den Komplex gebunden wird. Die Bindung der tRNA^{iMet} macht den ternären Komplex komplett und die Translationsinitiation kann eingeleitet werden (Abbildung verändert nach Gebauer & Hentze, 2004; Perzlsmaier et al., 2013).

Dies deutete darauf hin, dass Cdc123 für den Zusammenbau von eIF2 verantwortlich ist, indem es an die γ -Untereinheit bindet und daher für die Funktion von eIF2 und die damit verbundene Translationsinitiation unerlässlich ist. Die wichtige Rolle von *CDC123* in der Translationsinitiation wurde mithilfe von Polysomen-Analysen in *CDC123*-Mutanten getestet (Perzlsmaier et al., 2013). Hier konnte eine Reduktion des Polysomen zu Monosomen Verhältnis gefunden werden. Cdc123 bindet nur an die DIII von eIF2 γ , eine Deletion des Assemblierungsfaktors kann durch Überexpression der α und γ -Untereinheiten gerettet werden.

Am Ende der Translationsinitiation erfolgt die Hydrolyse von GTP an eIF2 durch eIF5 und das Phosphat wird freigesetzt (Aitken & Lorsch, 2012). Der eukaryotische Initiationsfaktor 2 verliert die Affinität zur tRNA^{iMet} und dissoziiert vom IK (Jackson et al., 2010). Für einen erneuten Start der Translationsinitiation muss eIF2 reaktiviert werden, um den TK schnell wieder assemblieren zu können (Gebauer & Hentze, 2004; Pavitt, 2005; Proud, 2005). Für die Bildung des TK muss eIF2-GTP gebunden haben, sodass die Affinität zur tRNA^{iMe} erhöht wird (Abbildung 3-10). Der GEF-Faktor (eIF2B) von eIF2 katalysiert den Schritt von GDP zu GTP. Dieser Punkt ist ein Kontrollpunkt für die Translationsinitiation (siehe 3.3.3). Ist nicht ausreichend TK vorhanden, führt dies zu einer Inhibierung der globalen Translation. In einer Stresssituation wird die α -Untereinheit phosphoryliert, was zu einer Bindung an eIF2B führt. Da das phosphorylierte eIF2 als kompetitiver Hemmer von eIF2B wirkt und somit nicht reaktiviert werden kann, wird die Translationsinitiation folglich inhibiert.

Der Guanosin-Triphosphat-Austauschfaktor eIF2B besteht aus fünf Untereinheiten (Alone & Dever, 2006; Proud, 2005). In der Hefe werden diese durch *GCN3* (α), *GCD7* (β), *GCD1* (γ), *GCD2* (δ) und *GCD6* (ϵ) codiert. Gcd6 ist die größte Untereinheit und die katalytische Domäne. Mit Gcd1 formt sie einen katalytischen Subkomplex, welcher an eIF2 bindet und für den GDP-GTP-Austausch verantwortlich ist. Die anderen drei Untereinheiten bilden den regulatorischen Subkomplex (Pavitt et al., 1998). Sie haben keine GEF-Aktivität, binden jedoch die phosphorylierte Version von eIF2 mit einer höheren Affinität.

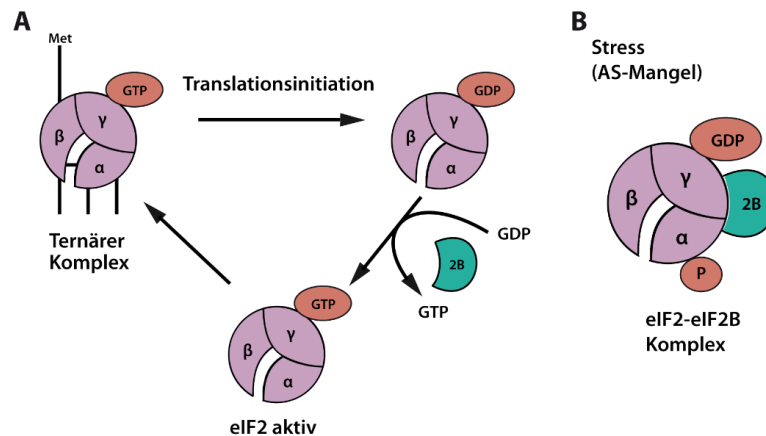


Abbildung 3-10: eIF2 Aktivierung für die Translationsinitiation. **A,** Translation kann initiiert werden, wenn der ternäre Komplex, bestehend aus eIF2-GTP und $tRNA_i^{Met}$, gebildet wurde. Nachdem das Startcodon erkannt wurde, erfolgt die Freisetzung von Phosphat, die Affinität von eIF2 zu $tRNA_i^{Met}$ ist geringer und eIF2 dissoziiert vom Komplex. Für eine schnelle Wiederaufnahme der Initiation muss der ternäre Komplex erneut gebildet werden. Hierfür wird eIF2 durch seinen GEF-Faktor eIF2B (grün) reaktiviert. Eine neue Runde der Translationsinitiation kann stattfinden. **B,** Bei Stresssituationen wird die α -Untereinheit von eIF2 phosphoryliert (P). Dadurch entsteht eine stärkere Bindung zu eIF2B. eIF2 kann nicht reaktiviert werden, die globale Translation ist inhibiert (Abbildung verändert nach Gebauer & Hentze, 2004).

3.3.3 Regulation der Initiation durch eIF2 α -Phosphorylierung

Die Genexpression kann an unterschiedlichen Stellschrauben reguliert werden (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Die Kontrolle der Translation ermöglicht es einem biologischen System schnell auf bestimmte Einflüsse zu reagieren, indem das Proteinlevel reguliert wird. Bei Betrachtung der gesamten Proteinbiosynthese ist die Initiation am stärksten reguliert, wobei die Erkennung des Startcodons und Bindung der $tRNA_i^{Met}$ entscheidende Schritte darstellen. So können RNA-Strukturen oder uORFs die Ribosomen-Bindungen sowie das Scanning bzw. die Erkennung des richtigen Startcodons erschweren. Die Regulation der Translation kann ebenfalls durch die Inaktivierung der Initiationsfaktoren ablaufen. Auslöser dafür sind häufig Stressbedingungen wie Nährstoffmangel.

Ein sehr gut untersuchter Weg der Translationsregulation ist die Phosphorylierung von eIF2 (Gebauer & Hentze, 2004). Hier wird in Stresssituationen die α -Untereinheit durch spezifische Kinasen phosphoryliert. In Eukaryoten sind vier eIF2 α -Kinasen, alle Serin-Threonin-Kinasen, gut charakterisiert (Donnelly et al., 2013). Sie alle spielen bei der Inhibierung der Proteinsynthese eine wichtige Rolle. Die PKR („*protein kinase double-stranded RNA-dependent*“ oder EIF2AK2)

phosphoryliert eIF2 α nach einer viralen Infektion und liegt ebenfalls nach oxidativem ER- (Endoplasmatisches Retikulum) Stress aktiv vor. Die PERK („*PKR-like ER kinase*“ oder EIF2AK3) wird aktiviert, wenn Proteine falsch gefaltet wurden und im ER akkumuliert vorliegen. Die HRI („*heme-regulated inhibitor*“ oder EIF2AK1) fungiert als Häm-Sensor (Burwick & Aktas, 2017; Donnelly et al., 2013). Liegt ein Defekt vor, so wird die Kinase aktiviert und die Globin-Translation daraufhin inhibiert. Die letzte gut charakterisierte eIF2 α -Kinase ist Gcn2 („*general control non-derepressible-2*“ oder EIF2AK4). Die Kinase ist ein Sensor für das Aminosäurelevel in den Zellen und wird nach Aminosäuremangel aktiviert (Donnelly et al., 2013). In *S. cerevisiae* ist nur einer der vier eIF2 α -Kinase charakterisiert, welche von *GCN2* codiert wird. Gcn2 reagiert auf Aminosäuremangel (Hinnebusch, 2005; Zhan et al., 2004). Die Kinase besitzt eine Domäne, die der Aminoacyl-tRNA-Synthetase ähnlich ist. Bei Aminosäuremangel akkumulieren unbeladene tRNAs und binden an diese Domäne. Die Akkumulation führt zu einer Gcn2-Aktivierung und folglich zur eIF2 α -Phosphorylierung (Proud, 2005). Die eIF2 α - Untereinheit wird sowohl in der Hefe als auch in Säugern am Serin 51 durch die beschriebenen Kinasen, je nach Stresssituation, phosphoryliert. Das modifizierte Protein bindet nun mit einer höheren Affinität eIF2B, sodass kein Nukleotidaustausch stattfinden kann. Der Zelle steht folglich weniger TK zur Verfügung und die globale Translation wird inhibiert (Gebauer & Hentze, 2004; Pavitt, 2005; Proud, 2005). Allerdings findet die Translation von bestimmten mRNAs in solchen Stresssituationen verstärkt statt (Holcik & Sonenberg, 2005). So wird zum Beispiel in der Hefe *GCN4* (*ATF4* in Säugern) verstärkt translatiert (Abbildung 3-11 unten). Die selektive *GCN4*-Translation, vermittelt durch die eIF2 α -Phosphorylierung, wurde in den letzten Jahrzehnten gut untersucht. Gcn4 ist ein Transkriptionsaktivator für Gene, die für die Aminosäure-Biosynthese codieren und ist bei Aminosäuremangel aktiv. Dieses System wird auch als allgemeine Kontrolle der Aminosäure-Biosynthese bezeichnet („*general control of amino acid biosynthesis*“; Grundmann et al., 2001).

Gcn4 hat einen langen 5'-*Leader* mit 4 uORFs, die für die Regulation der Translation eine entscheidende Rolle spielen. Das Fehlen von nur einer Aminosäure führt zu einer verstärkten Transkription von mehr als 50 Genen, die für Enzyme der Aminosäurebiosynthese-Wege und für die Aminosäure tRNA-Synthetasen codieren (Grundmann et al., 2001). Zellen, in denen genügend Aminosäuren zur Verfügung stehen, besitzen keine erhöhte Gcn2-Aktivität. Das aktive eIF2-GTP bzw. der TK liegt dementsprechend ausreichend vor, um die Translationsinitiation zu starten. Die uORFs in *GCN4* sind für eine ineffiziente Translation verantwortlich. Sie stellen eine Art Barriere dar und durch Deletion aller 4 uORFs wird eine starke *GCN4*-Translation detektiert (Hinnebusch, 2005). Die Translation von Gcn4 wird am ersten uORF initiiert (Hinnebusch, 2005; Gebauer & Hentze, 2004). Nach dem Stopcodon erfolgt die Dissoziation der Ribosomen, jedoch bleibt in etwa 50% der Fälle die 40S-Untereinheit an der mRNA und scannt diese weiter ab. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Initiationsfaktoren eIF3 und eIF4G während der Translation des uORFs am Ribosom gebunden bleiben (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Dies könnte für eine schnelle Reinitiation des uORFs, nach der Termination

sorgen. Für die Reinitiation des nächsten Startcodons müssen die Initiationsfaktoren sowie der TK erneut an das 40S-Ribosom binden. Je nachdem, wann der TK an das 40S-Ribosom bindet, wird das darauffolgende uORF translatiert (Holcik & Sonenberg, 2005). Eine Reinitiation nach jedem uORF tritt bei hoher TK-Konzentration häufig auf. So werden die uORFs 2, 3 oder 4 in *GCN4* reinitiiert, wohingegen der *GCN4*-ORF nach der Termination nicht mehr gut initiiert werden kann (Abbildung 3-11 oben). Vor allem sind die uORFs 3 und 4 negative Elemente, die eine Translation des *GCN4*-ORFs erschweren (Hinnebusch, 2005). Herrscht Aminosäuremangel, so wird eIF2 α durch Gcn2 phosphoryliert. Die Bindung zu eIF2B liegt verstärkt vor und weniger TK kann gebildet werden, weshalb eine Inhibierung der uORF-Reinitiation folgt (Abbildung 3-11 unten). Das 40S-Ribosom setzt das Scannen der mRNA fort, bis der TK bindet. Bei etwa 50% der Ribosomen erfolgt das Binden erst nach dem letzten uORF. Der *GCN4*-ORF kann nun verstärkt abgelesen und die Antwort auf den Aminosäuremangel eingeleitet werden. Die globale Translation wird währenddessen inhibiert (Hinnebusch, 2005).

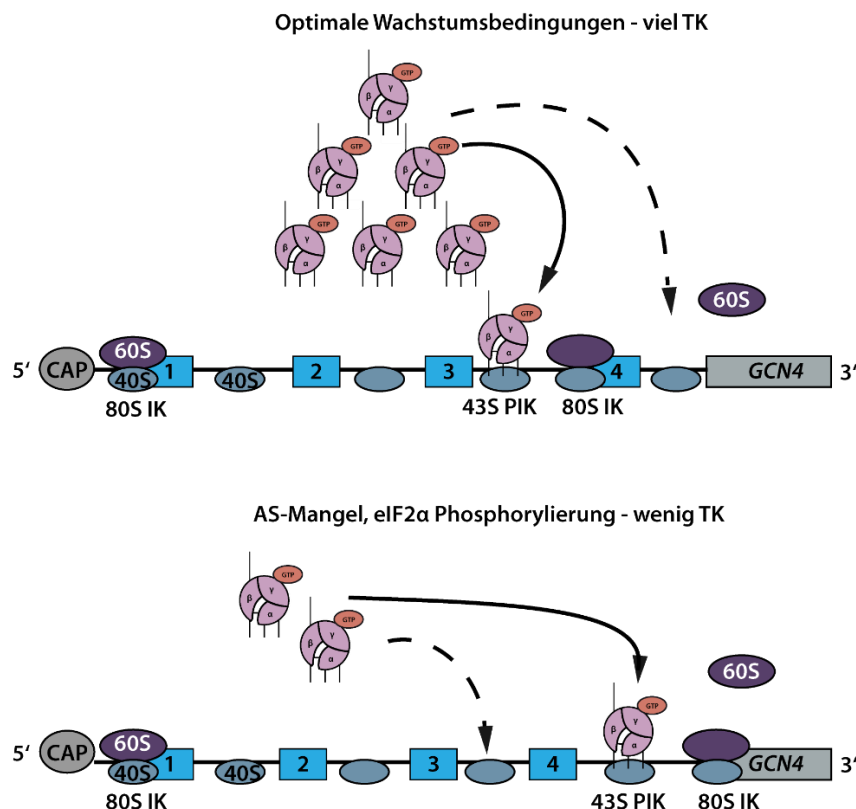


Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der *GCN4*-Translation. Dargestellt ist die *GCN4* mRNA mit 4 uORFs (blau). Oben: Normale Wachstumsbedingungen, kein Aminosäuremangel, der ternäre Komplex (Rosa mit Initiator tRNA, TK) ist hoch konzentriert. Translationsinitiation am ersten uORF. Dissoziation der 60S-Untereinheit (lila). Das 40S-Ribosom mit wahrscheinlich weiteren Initiationsfaktoren scannt die mRNA ab, bis erneut ein ternärer Komplex bindet (43S-Komplex). Reinitiation von uORF 2-4 ist bei hohem Level an ternären Komplex häufig (kontinuierlicher Pfeil), wohingegen die Translation von *GCN4*-ORF (grau) unter gleichen Bedingungen selten ist. (gestrichelter Pfeil). Unten: Ein Aminosäuremangel führt zu einer Gcn2 vermittelten Phosphorylierung von eIF2 α , gefolgt von weniger ternärem Komplex. Die Reinitiation der uORFs tritt seltener auf (gestrichelter Pfeil), wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das *GCN4*-ORF translatiert wird (kontinuierlicher Pfeil). Die 40S-Ribosomen können, nach vorheriger Bindung des ternären Komplexes, bis zum ORF scannen (Abbildung verändert nach Gebauer & Hentze, 2004).

Cherkasova und Kollegen veranschaulichten, dass die Phosphorylierung von eIF2 α zudem durch die Kinase Snf1, die für die Derepression der Glukose-reprimierten Gene mit verantwortlich ist, induziert werden kann (Cherkasova et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass während des Aminosäuremangels (Histidin) die Funktion von Gcn2 durch Snf1, unabhängig der Kohlenstoffquelle, stimuliert wird (Abbildung 3-12 A). Die Inaktivierung von Snf1 verringert die Gcn2-Aktivität und folglich die eIF2 α -Phosphorylierung nach Aminosäuremangel. Eine Deletion von *REG1* hingegen verstärkt die eIF2 α -Phosphorylierung. Nachdem Glukose verbraucht wurde, liegt Glc7-Reg1 gehemmt vor (vgl. 3.1.2.2). Dies führt zu einer verstärkten Snf1-Aktivität. Zusätzlich kann die eIF2 α -Phosphorylierung durch Snf1 in nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen gefördert werden. Hier erfolgt eine Inhibierung von Glc7, der eIF2 α -Phosphatase (Abbildung 3-12 B).

In der Humanpathologie hat die Regulation der Translationsinitiation über die eIF2 α -Phosphorylierung eine große Bedeutung. Mutationen in eIF2B führen zu neurodegenerativen Erkrankungen (Scheper et al., 2007). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Mutationen in der eIF2 α -Kinase PERK verantwortlich für das Wolcott-Rallison-Syndrom (WRS) sind. WRS ist einen seltene autosomale, rezessive Erkrankung, die durch frühe Diabetes, Skelettanomalien und Leberfunktionsstörungen charakterisiert wird (Delépine et al., 2000; Rubio-Cabezas et al., 2009).

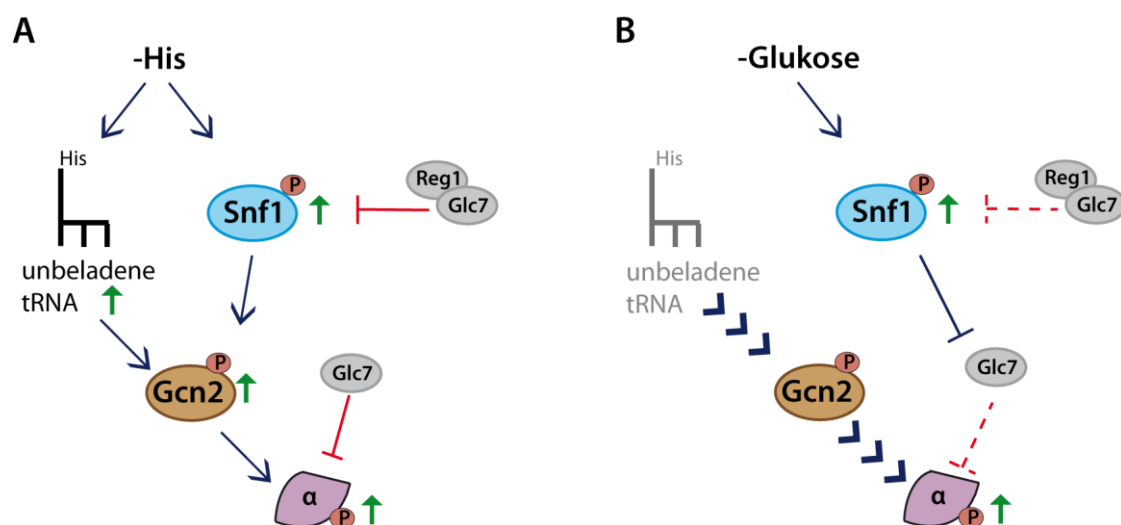


Abbildung 3-12: Modell der Snf1-Regulation von eIF2 α -Phosphorylierung. **A,** Nach Histidin-Mangel akkumulieren die unbeladenen tRNAs. Dadurch wird Gcn2 aktiviert und eIF2 α phosphoryliert. Die Phosphatase (Glc7) von eIF2 α kann die Untereinheit wieder dephosphorylieren. Snf1 trägt ebenfalls zur Gcn2-Aktivierung nach Aminosäuremangel bei. Snf1 wird durch seine „upstream“-Kinasen aktiviert, durch Glc7-Reg1 dephosphoryliert und inaktiv gehalten (vgl. 3.1.2.2). **B,** Steht der Zelle keine fermentierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung, wird Snf1 aktiviert und könnte die eIF2 α -Phosphatase inhibieren. Die Untereinheit kann daraufhin nicht dephosphoryliert werden. Die unbeladenen tRNAs sind auf einem niedrigen Niveau (grau) und die Gcn2-Aktivität auf einem basalen Level. P= Phosphorylierung, grüner Pfeil=aktiviert, Rot=inhibiert, gestrichelte Pfeile= seltenes Ereignis (vereinfachte und veränderte Abbildung nach Cherkasova et al., 2010).

3.4 Zielsetzung

Daten, die zuvor in der Arbeitsgruppe generiert wurden, bestätigen die Notwendigkeit von Cdc123 für den Zellzykluseintritt. So wurde gezeigt, dass Hefezellen, die ein defektes Cdc123 besitzen, nicht aus G1 austreten und in die S-Phase eintreten können (Perzlmaier et al., 2013). Interessanterweise konnte durch Depletionen der eIF2-Untereinheiten ebenfalls ein G1-Zellzyklusarrest festgestellt werden. Ebenso führte die Depletion von eIF2B-Untereinheiten zu einem Zellzyklusstopp und die Zellen arretierten in G1. Bei den Depletionen von anderen, translationsinitiiierenden Faktoren konnte ein solcher G1-Arrest nicht beobachtet werden. Dies führte zu dem Schluss, dass der Eintritt in den Zellzyklus besonders empfindlich auf die Funktion von eIF2 reagiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der durch eIF2 ausgelösten Translationsinitiationsstörung näher zu untersuchen. Durch die Herstellung und Charakterisierung von Mutanten, die in der eIF2-Funktion inhibiert waren, soll die Störung der Translationsinitiation analysiert werden. Eine phänotypische Charakterisierung soll den Unterschied der eIF2-Mutanten zum Wildtyp hervorbringen. Zusätzlich soll durch unvoreingenommene Analysen (RNA-Sequenzierung), der beobachtete Zusammenhang zwischen dem Eintritt in den Zellzyklus und der Proteinsynthese analysiert werden. Die RNA-Sequenzierung sowie Polysomen-Profile sollen Aufschluss über veränderte mRNAs geben, die auf eine reduzierte Aktivität von eIF2 reagieren. Potenziell wichtige bzw. veränderte Kandidaten werden aus dem Sequenzierungsdaten selektiert und für weitere Analysen herangezogen.

4 ERGEBNISSE

Die Translationsinitiation ist ein komplizierter Mechanismus, der viele unterschiedliche Schritte enthält (Dever et al., 2016). Hierbei spielen die Bildung und Verfügbarkeit des ternären Komplexes eine entscheidende Rolle. Die stressabhängige Phosphorylierung von eIF2 α , gefolgt von der geringeren Menge an ternären Komplex gehört zur Schlüsselregulation der Translation. Durch diese stressbedingte Reaktion erfolgt eine Inhibierung der globalen Translation.

Für die Untersuchungen der eIF2 vermittelten Translationsinitiationsstörung wurden unterschiedliche, zuvor hergestellte Mutanten gewählt (eIF2-Mutanten). Diese waren entweder in der Assemblierung von eIF2 oder in der Bildung des ternären Komplexes (TK) beeinträchtigt. Mithilfe der Transkriptom-Analyse konnten mRNAs detektiert werden, die durch die eIF2 Funktionsstörungen beeinflusst waren. Die Auswertung der Sequenzierung, lieferte neben einer erhöhten Expression von atmungsspezifischen Genen, eine Repression der Gene, die für die Enzyme der Glykolyse codieren. Es war möglich, eine veränderte Glukose gesteuerte Genexpression in den eIF2-Mutanten zu ermitteln. Funktionelle Analysen, wie Deletionen und Überexpressionen von ausgewählten Genen, bestätigten diese Daten. Untersuchungen der Lokalisation und Strukturen mithilfe von Lebend-Zell-Mikroskopie bekräftigten ebenfalls diese Ergebnisse.

4.1 Charakterisierung der eIF2-Mutanten

Während der Translationsinitiation bindet das zuvor assemblierte eIF2 die tRNA_i^{Met} und bildet den TK (Aitken & Lorsch, 2012). Stresssituationen wie Aminosäuremangel führen zu einer Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit, gefolgt von weniger TK und Inhibierung der globalen Translation (Hinnebusch, 2005). Ziel dieser Arbeit war es, die Folge einer durch eIF2 vermittelten Translationsinitiationsstörung näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche eIF2-Mutanten teilweise neu hergestellt und analysiert (Abbildung 4-1 A).

Die Störung der Translationsinitiation kann an unterschiedlichen Stellen induziert werden. In dieser Arbeit wurde eine Cdc123-Verkürzung hergestellt, um die Assemblierung von eIF2 zu inhibieren. Hierbei wurde die schon zuvor charakterisierte Verkürzung von Cdc123 ab Aminosäure 327 (Perzlmaier, 2011) weiter, mithilfe des pFA6a-Systems, gekürzt (Longtine et al., 1998). Durch homologe Rekombination in einen diploiden Stamm wurde anstelle der letzten 102 Basen von *CDC123* die Sequenz des Hämagglutinin- (HA) Epitops inseriert. Das Anfügen dieser Sequenz ermöglichte der Nachweis der positiven Klone mithilfe des Western-Blots. Tetraden-Analysen des heterozygot diploiden Stamms lieferten daraufhin Aussagen über die Auswirkungen der Verkürzung von Cdc123.

Im Stammhintergrund W303 konnte von *CDC123* ein weiteres Codon deletiert werden, bevor die Auswirkung letal war. Im Stammhintergrund S288c war eine Verkürzung von Cdc123 sogar um zwei Aminosäuren möglich (Abbildung 4-1 B). Zudem war ersichtlich, dass die verkürzten Varianten von Cdc123 kleinere Kolonien bildeten.

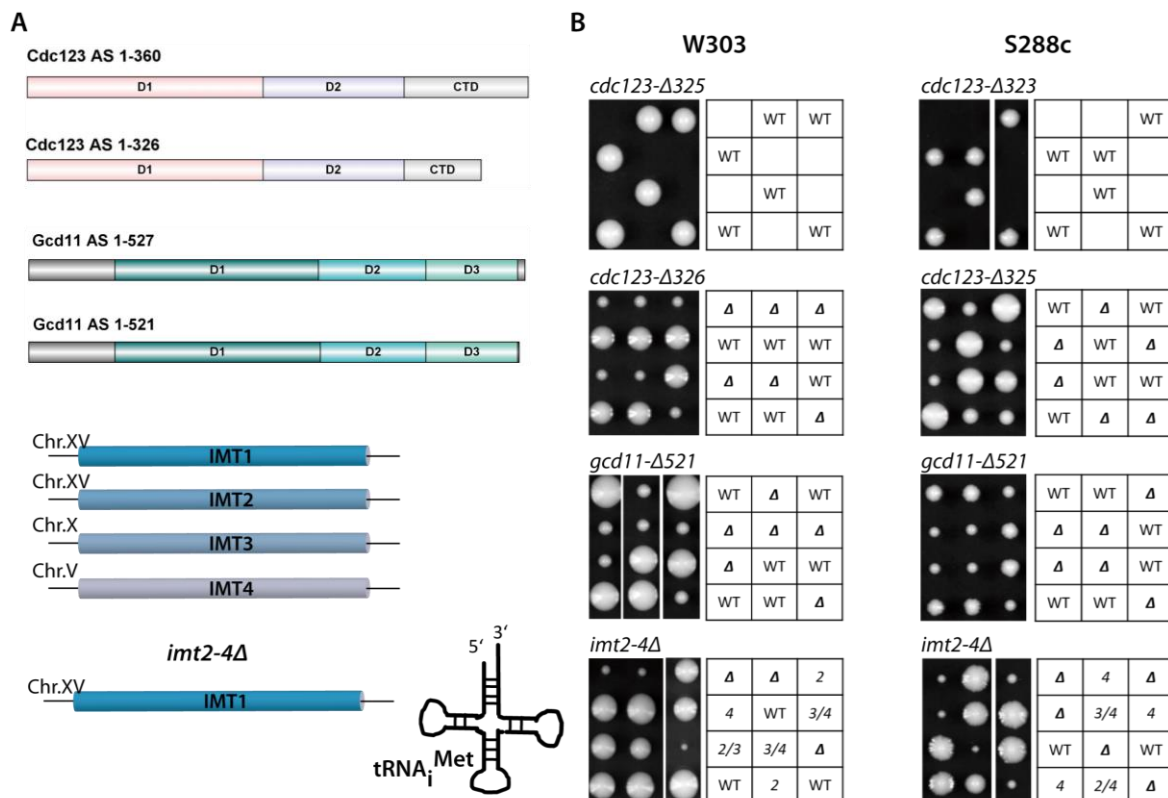


Abbildung 4-1: eIF2 defiziente Mutanten. **A**, Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten Varianten von Cdc123, Gcd11 und *IMT1-4*, die für die Arbeit herangezogen wurden. Die Gene *IMT2-4* wurden deletiert. Der Assemblierungsfaktor Cdc123 wurde bis zur Aminosäure (AS) 326 gekürzt. Ebenfalls wurde eine verkürzte Variante von Gcd11 für die Arbeit herangezogen. **B**, Die Kreuzung von W15640 (*imt4Δ imt3Δ*) mit W15696 (*imt2Δ*), wurde zunächst selektiert und sporuliert. Ebenfalls wurden die heterozygot diploiden Stämme im W303 und S288c Stammhintergrund, *CDC123/cdc123Δ323-HA3* *CDC123/cdc123Δ325-HA3* und *CDC123/cdc123Δ326-HA3*, sowie *GCD11/gcd11Δ521* (W15565, W15904) und *IMT1/imt1Δ* *IMT2/imt2Δ* *IMT3/imt3Δ* *IMT4/imt4Δ* (W12996) sporuliert. Die daraus resultierenden haploiden Nachkommen wurden auf einer XYD-Platte vereinzelt, bei 30°C inkubiert und der Genotyp bestimmt. Dargestellt sind jeweils vier repräsentative Tetraden in vertikaler Richtung. Für Cdc123 konnte festgestellt werden, dass nur die Verkürzungen Δ325 im S288c und Δ326 im W303 lebensfähig waren und zudem kleinere Kolonie hervorbrachten (Δ= Verkürzung). Die *gcd11-Δ521* Verkürzung (Δ= Verkürzung) sowie die Deletionen der *IMT*-Gene lieferten ebenfalls kleinere Kolonien. (Δ=*imt2-4Δ*; 2=*imt2Δ*; 4=*imt4Δ*; 2/3=*imt2-3Δ*; 3/4=*imt3-4Δ*; 2/4=*imt2,4Δ*). In allen Tetraden-Analysen WT=Wildtyp.

Für die Analyse der direkten eIF2-Funktionsstörung, wurde neben der Cdc123-Verkürzung eine eIF2γ-Mutante herangezogen. Diese war nach der Aminosäure 521 verkürzt (Abbildung 4-1 A). Auch hier konnte festgestellt werden, dass sich weitere Verkürzungen letal auf die Hefezellen auswirkten (Sven Vanselow, Daten unveröffentlicht). Die Tetraden-Analysen ergaben bei der eIF2γ-Verkürzung ebenfalls eine deutlich verminderte Koloniegröße im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4-1 B).

Die dritte Mutante, die in dieser Arbeit näher untersucht wurde, enthielt drei Gendeletionen (*imt2-4Δ*) der vier identischen Initiator-Methionin-tRNA-Gene (*IMT1-4*, Abbildung 4-1 A). Die Deletion des übrig gebliebenen Gens würde ebenfalls zur Letalität führen (Byström & Fink, 1989). Mithilfe der deletierten *IMTs* kann die Initiation der Translation anhand der verringerten TK-Menge analysiert werden. Den größten Wachstumsdefekt und damit die kleinsten Kolonien

konnte in der *imt2-4Δ* gefunden werden (Abbildung 4-1 B). Die Deletion von zwei *IMT* Genen zeigten ein mit Wildtyp vergleichbares Wachstum. Alle für die Arbeit verwendeten eIF2-Mutanten waren lebensfähig, hatten jedoch Wachstumsdefekte.

4.1.1 Gcn4-Analysen in eIF2-Mutanten

Die Kontrolle der Translation ermöglicht schnell, auf bestimmte Einflüsse zu reagieren (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Die Phosphorylierung von eIF2 α ist ein gut analysierter Regulationsweg. Hierbei wird unter Stressbedingungen die α -Untereinheit phosphoryliert und die globale Translation inhibiert (Gebauer & Hentze, 2004; Pavitt, 2005; Proud, 2005). Zudem findet die Translation von bestimmten mRNAs wie *GCN4* verstärkt statt. Wie schon zuvor Hinnebusch beschrieben hat, erfolgt unter optimalen Wachstumsbedingungen eine Reinitiation der *GCN4*-uORFs 2, 3 und 4 (Hinnebusch, 1985). Bei Störungen der Translation wird das *GCN4*-ORF, aufgrund der geringeren Verfügbarkeit des TK, stärker abgelesen (vgl. 3.3.3, Abbildung 4-2 A rechts). Wegen der eingeschränkten Translationsinitiation in den eIF2-Mutanten war die Untersuchung der *GCN4*-Translation für die Charakterisierung der Mutanten notwendig. Hierfür wurde die lange 5'-Region inkl. den 4 uORFs und dem *GCN4*-Promotor in den eIF2-Mutanten mithilfe eines *GCN4-lacZ* Reporter-Assays analysiert (Abbildung 4-2 A). In allen eIF2-Mutanten konnte eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität, im Vergleich zum Wildtyp, gemessen werden. Eine deutlich Erhöhung der Aktivität und folglich eine verbesserte Expression der langen 5'-Region konnte in der *imt2-4Δ*-Mutante im W303 und im S288c Stammhintergrund detektiert werden (W303 10 U im Wildtyp, 207 U in *imt2-4Δ*, im S288c 5 U im Wildtyp, 107 U in *imt2-4Δ*, Abbildung 4-2 B). Zudem war die gemessene Aktivität in den *gcd11-Δ521*- und in den *cdc123-Δ326*-Mutanten noch stärker erhöht, im Vergleich zum Wildtyp (W303 10 U im Wildtyp, 22 U in *gcd11-Δ521*, 103 U in *cdc123-Δ326*, S288c 5 U im Wildtyp, 14 U in *gcd11-Δ521* U, in *cdc123-Δ326* 27 U, Abbildung 4-2 B). Bei Betrachtung der Koloniegrößen konnte jedoch zwischen der *gcd11-Δ521*- und der *cdc123-Δ326*-Mutante kein sichtbarer Unterschied detektiert werden (vgl. Abbildung 4-1 B). Die Deletion der *IMT* Gene zeigte auch in der Tetraden-Analyse den größten Effekt. Daraus lässt sich folgern, dass sich eIF2-Mutanten hinsichtlich des Wachstums und der *GCN4*-Translation unterschieden. Die *GCN4*-Expression in *gcd11-Δ521* und *cdc123-Δ326* korreliert jedoch nur bedingt mit dem Wachstum der Zellen.

Neben dem Reporter-Assay wurde zusätzlich die Proteinmenge von Gcn4 in den eIF2-Mutanten analysiert, um zu untersuchen, ob ebenfalls mehr Protein in den Mutanten detektiert werden kann. Hierfür wurde Gcn4 C-terminal mit FLAG12 markiert und die eIF2-Mutanten in der Western-Analyse untersucht. Gcn4 konnte am stärksten in der *imt2-4Δ*-Mutante detektiert werden, wobei auch die anderen eIF2-Mutanten eine erhöhte Gcn4-Menge im Vergleich zum Wildtyp hatten (Abbildung 4-2 C). Die erhöhte Proteinmenge von Gcn4 in den Mutanten bestätigt die zuvor erhobenen *GCN4-lacZ*-Daten. Aufgrund der regulierten *GCN4*-Translation führen die Verkürzungen in Cdc123 und Gcd11 und auch die Deletion der 3 *IMT*-Gene zu einem messbaren Unterschied in der Gcn4-Menge im Vergleich zur wildtypischen Situation.

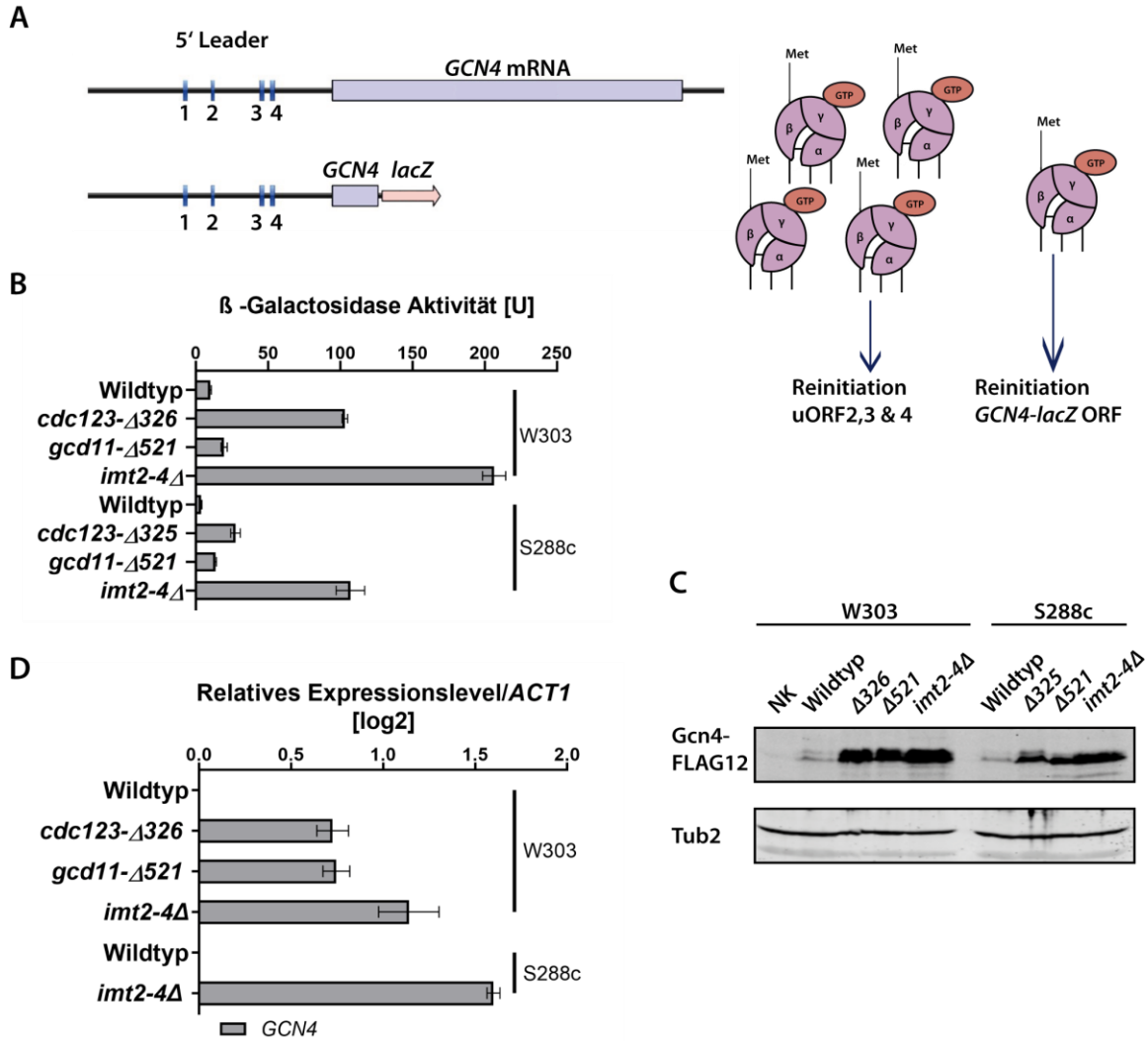


Abbildung 4-2: GCN4-Analysen in eIF2-Mutanten. **A**, Schematische Darstellung des *GCN4-lacZ* Reporter-Assays. Der Transkriptionsfaktor besitzt in seinem 5'-Leader 4 uORFs. Bei erhöhten Mengen des ternären Komplexes werden die uORFs 1-4 reinitiiert, was zu einer verminderten *GCN4*-Translation führt. Wenn weniger des ternären Komplexes vorhanden ist, erfolgt die Reinitiation seltener, das *GCN4*-ORF kann abgelesen und die β -Galaktosidase-Aktivität kann mithilfe eines Substrates gemessen werden. **B**, Für den *GCN4-lacZ* Reporter-Assay wurden die Stämme K699 und BY4741 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W16248 (*cdc123-Δ325*) W15566 und W15905 (W303, S288c *gcd11-Δ521*), und W13036 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) mit pWS1429 bzw. W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) mit pWS3396 transformiert. Die Zellen wurden in SD-U bzw. SD-L bei 25°C über Nacht angezogen. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde mithilfe eines ONPG-Tests nach der Absorptionsmessung bei 420 nm mit der Formel 6-2 berechnet. Von jedem Stamm wurden 4 unterschiedliche Klone für den Test verwendet und Mittelwert sowie Standardabweichung gebildet. **C**, Die Proteinlysate wurden aus folgenden über Nacht in XYD bei 25°C exponentiell wachsenden Zellen hergestellt: K699 (NK) W18100 und W18104 (W303, S288c, *GCN4 FLAG12*), W18101 (*cdc123-Δ326 GCN4 FLAG12 (Δ326)*) W18102 und W18106 (W303, S288c, *GCN4 FLAG12 gcd11-Δ521 (Δ521)*) W18103 und W18107 (W303, S288c, *GCN4 FLAG12 imt2Δ imt3Δ imt4Δ (imt2-4Δ)*) W18105 (*GCN4 FLAG12 cdc123-Δ325 (Δ325)*). Für die Western-Analyse wurden 2 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Gcn4 mit einem FLAG-spezifischen Antikörper (α -FLAG M2). Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen, hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α -Tubulin2 (Tub2). **D**, Für die Isolation der mRNA wurden die über Nacht in XYD bei 25°C exponentiell wachsenden Stämme aus A (ohne W16248 und W15905) geerntet und mit der Phenol-Chloroform-Methode isoliert. Für die cDNA-Synthese wurde 50 ng RNA eingesetzt. Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Rotor-Gene Q (Qiagen), wobei „SYBR Green“ als DNA interkalierender Farbstoff eingesetzt wurde. Als Referenz-Gen wurde Aktin (*ACT1*) herangezogen. Die *GCN4*-Menge wurde auf *ACT1* normalisiert. Die Werte wurden auf den Wildtyp bezogen. Dargestellt sind die log₂ Werte.

Die verwendete eIF2-Mutante bildet weniger des TK aus, was eine beeinträchtigte Translationsinitiation zur Folge hat. Wie in den Daten zuvor gezeigt, führt die Störung in der Translationsinitiation zur Induktion der *GCN4*-Translation. Das gängige Model beschreibt einen Anstieg der *GCN4*-Translation innerhalb weniger Minuten nach Aminosäuremangel (Albrecht et al., 1998; Hinnebusch, 1985). Zudem konnte ein Anstieg des *GCN4*-Transkriptionslevels 3-4 Stunden nach der Behandlung von 3-Aminotriazole oder nach Stickstoffmangel detektiert werden (Albrecht et al., 1998; Grundmann et al., 2001). Da in den eIF2-Mutanten eine dauerhafte Störung der Translationsinitiation vorherrscht, lag die Vermutung nahe, dass auch die *GCN4*-mRNA-Menge in den Mutanten erhöht vorliegt. Um dies zu testen, wurde die Gesamt-RNA aus den Stämmen isoliert, cDNA synthetisiert und mithilfe der quantitativen Polymerasen Kettenreaktion (qPCR „*quantitative polymerase chain reaction*“) die *GCN4*-mRNA-Menge analysiert. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse bestätigen die Annahme. Die *GCN4*-mRNA war in den eIF2-Mutanten moderat erhöht. In der *cdc123-Δ326*- und der *gcd11-Δ521*-Mutante war *GCN4* im Vergleich zum Wildtyp weniger als doppelt so hoch (log2 Veränderungen der Mutanten zum Wildtyp, 0,73 in *cdc123-Δ326*, 0,75 in *gcd11-Δ521*). In der *imt2-4Δ*-Mutante war erneut der stärkste Effekt zu beobachten. Hier konnte eine mehr als doppelt so hohe *GCN4*-Menge im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden (log2 Veränderungen *imt2-4Δ* zum Wildtyp im W303 1,14, im S288c log2 1,6, Abbildung 4-2 D). Beim Vergleich der Transkriptdaten mit der zuvor gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität des *GCN4-lacZ* Reporter-Assays, ist der Effekt jedoch deutlich geringer. Die Derepression der *GCN4*-Translation in den eIF2-Mutanten hat demnach auch einen Einfluss auf die mRNA-Menge. Daraus lässt sich schließen, dass die jeweiligen eIF2-Mutanten unterschiedlich stark in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

4.1.2 Wachstums- und Zellzyklus-Analysen in eIF2-Mutanten

In den jeweiligen eIF2-Mutanten konnte unterschiedlich starke *GCN4*-Effekte detektiert werden. Zudem deuten die Tetraden-Analysen aus Abbildung 4-1 B auf ein verlangsamtes Zellwachstum der eIF2-Mutanten hin. Es stellte sich demnach die Frage, ob ein Wachstumseffekt in den jeweiligen Genotypen durch direkten Vergleich feststellbar ist. Somit wurde für die weitere Charakterisierung der Mutanten ein Spotttest durchgeführt. Hierfür wurden die eIF2-Mutanten über Nacht angezogen, am nächsten Tag auf Vollmedium-Platten (XY) mit Glukose (D) überführt und bei 25°C für 48 h inkubiert. In Abbildung 4-3 A ist der Wachstumstest der eIF2-Mutanten der beiden Stammhintergründen dargestellt und bestätigt die vorherigen Tetraden-Analysen. Die Mutanten aus beiden Stammhintergründen, besonderes jedoch die *imt2-4Δ*-Mutante, weisen ein sichtbar verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf.

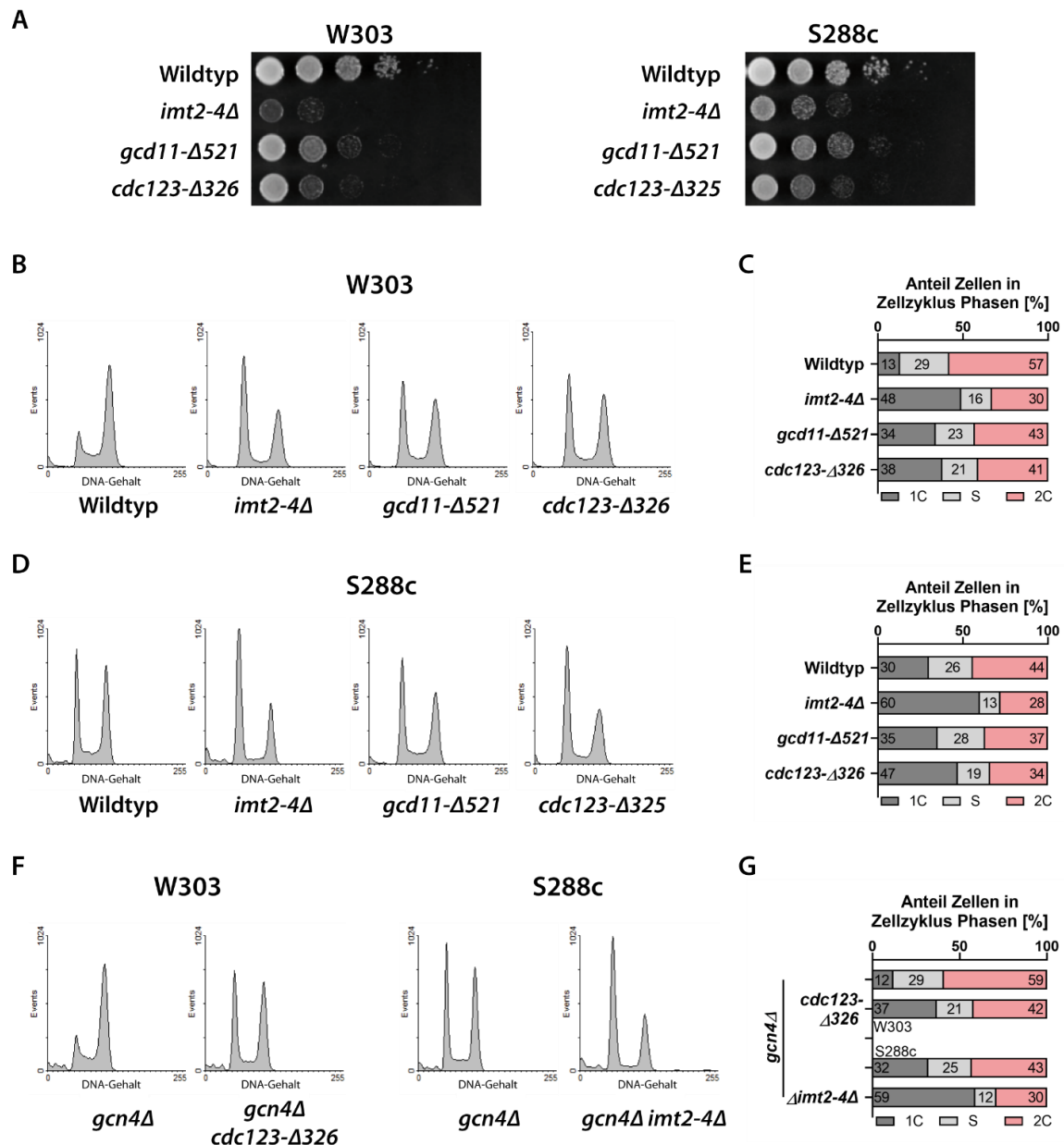


Abbildung 4-3: Wachstum und Zellzyklus ist in eIF2-Mutanten verändert. **A**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 und BY4741 (Wildtyp) W13036 und W15766 (W303 und S288c *imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) W15596 (*cdc123-Δ326*) W16248 (*cdc123-Δ325*) W15566 und W15905 (W303 und S288c *gcd11-Δ521*) über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **B,D**, Die Stämme aus A wurden für die Zellzyklus-Analyse über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und die exponentiell wachsenden Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **F**, Die Stämme W14785 und W9056 (W303 und S288c *gcn4Δ*), W15485 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*) und W15842 (*cdc123-Δ326 gcn4Δ*) wurden wie in B und D behandelt. **C,E,G**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Für einen Wiedereintritt der Zellen in den Zyklus müssen die Zellen eine hinreichende Fähigkeit zur Proteinbiosynthese aufweisen, um einen gewissen Schwellenwert zu erzielen (Polymenis & Aramayo, 2015). Zusätzlich konnte Sabine Weinzierl zeigen, dass die Depletion einer eIF2-Untereinheit einen Zellzyklusarrest zur Folge hat (Weinzierl, 2011). Um die hergestellten sowie

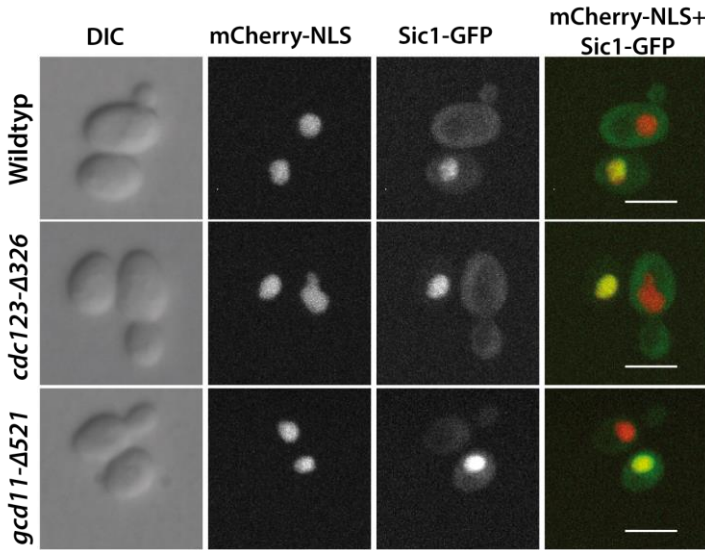
vorhanden Mutanten weiter zu charakterisieren, wurde sowohl im W303 sowie im S288c Stammhintergrund der Zellzyklus untersucht (Abbildung 4-3 B, D). Hierbei wurden exponentiell wachsende Zellen fixiert und mit „*Sytox Green*“ für mehrere Tage inkubiert. Dieser fluesszierende Farbstoff interkaliert in die DNA wodurch die Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (1C) und doppeltem DNA-Gehalt (2C) mithilfe des Durchflusszytometers gemessen werden konnten. In den Mutanten wurden deutlich mehr 1C-Zellen im Vergleich zum Wildtyp detektiert (im W303, 1C-Zellen im Wildtyp 13% in *gcd11-Δ521* 34%, in *cdc123-Δ326* 38% und 49% in *imt2-4Δ*, im S288c hatte der Wildtyp 30%, die *gcd11-Δ521* 35%, die *cdc123-Δ325* 47% und die *imt2-4Δ* Mutanten 60% 1C-Zellen, Abbildung 4-3 B-E). Neben dem Effekt innerhalb eines Stammhintergrundes wurden die bekannten Unterschiede, mehr 2C-Zellen in W303 im Vergleich zu S288c, deutlich (W303 57% und S288c 44% Abbildung 4-3 B-E). Die Funktionsstörung von eIF2 führt demnach zu einem verschlechterten Zellzykluseintritt, wobei auch hier die verschiedenen Genotypen unterschiedlich stark beeinflusst waren.

Die vorherigen Analysen ergaben eine veränderte *GCN4*-Expression in den eIF2-Mutanten (vgl. Abbildung 4-2). Um einen möglichen Einfluss von *Gcn4* auf dem Zellzykluseintritt zu überprüfen, wurden neue eIF2-Mutanten mit einer zusätzlichen *GCN4*-Deletion generiert und Zellzyklus-Analysen durchgeführt. Wie auch die Mutanten mit intaktem *GCN4* hatten die Doppelmutanten (eIF2-Mutante *gcn4Δ*) vermehrt 1C-Zellen (im W303 12% im Wildtyp und 37% in *cdc123-Δ326*, im S288c 32% im Wildtyp und 59% in *imt2-4Δ*, Abbildung 4-3 F,G). Die Deletion von *GCN4* zeigte demnach keinen Effekt auf die Zellzyklus-Verteilung.

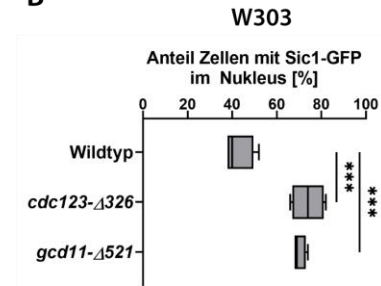
In der Hefe ist Sic1, ein bekannter Inhibitor der Cdks, für den G1/S-Übergang notwendig (Schwob et al., 1994; Barberis et al., 2005). Die Initiierung der Sic1-Degradation durch den SCF^{Cdc4}-Komplex führt zu einer Aktivierung der S-Phasen spezifischen Cycline Clb5-6 (Bertoli et al., 2013, Teixeira & Reed, 2013). In G1-Zellen ist Sic1 im Nukleus lokalisiert. Nach dem Ubiquitin vermittelten Abbau von Sic1 kann die Zelle in die S-Phase eintreten (Rossi et al., 2005). Angesichts des verspäteten Zellzykluseintritts der eIF2-Mutanten (vgl. Abbildung 4-3) stellte sich die Frage, ob ein Unterschied des Vorhandenseins von Sic1 zwischen den Genotypen festgestellt werden kann. Hierfür wurde *SIC1*, mit seinem eigenen Promotor, mit der Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert und ins Genom innerhalb eines Selektionsmarkers integriert. Die Stämme besaßen zusätzlich ein rotes Kernsignal (NLS fusioniert mit *m-Cherry*). Durch die Kreuzung des hergestellten Stammes mit den eIF2-Mutanten und anschließender Tetraden-Analyse konnte die gleiche Integrationsanzahl von *SIC1*-GFP in alle Genotypen gewährleistet werden. Die hergestellten Stämme wurden daraufhin mit dem „*Spinning Disc*“ Mikroskop analysiert. Die Betrachtung der exponentiell wachsenden Hefezellen erfolgte auf einem synthetischen Kompletmedium (S)-Agar (SD++ inkludiert Glukose und alle AS) unter physiologischen Bedingungen (Abbildung 4-4). Die Analyse der Mikroskopiedaten ergab, dass Sic1, im Stammhintergrund W303 im Wildtyp und auch in den eIF2-Mutanten hauptsächlich in Zellen ohne Knospe detektiert werden konnte. Allerdings war auffällig, dass Sic1 schon am

Ende der Mitose, noch vor der Zytokinese, im Nukleus vorlag. Bei der Betrachtung aller Zellen mit einem roten Kernsignal hatten in den eIF2-Mutanten mehr Zellen ein Sic1-GFP Signal im Vergleich zum Wildtyp ($n = 4 \times 50$ Zellen, W303, im Wildtyp 42,5%, in *cdc123-Δ326* 74% und in *gcd11-Δ521* 70% Sic1 im Nukleus, Abbildung 4-4 A-B). Der Vergleich zwischen Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt (vgl. Abbildung 4-3) und Sic1 positive Zellen brachte jedoch unterschiedliche Werte hervor. Dies lässt sich durch die differenzierte Auswertung erklären. Zellen, die sich noch nicht geteilt haben, jedoch am Ende der Mitose waren, wurden in der Durchflusszytometrie als eine Zelle mit doppeltem DNA-Gehalt ausgewertet. In der Mikroskopie wurden diese jedoch als zwei Zellen mit einem Sic1-GFP Signal ausgezählt.

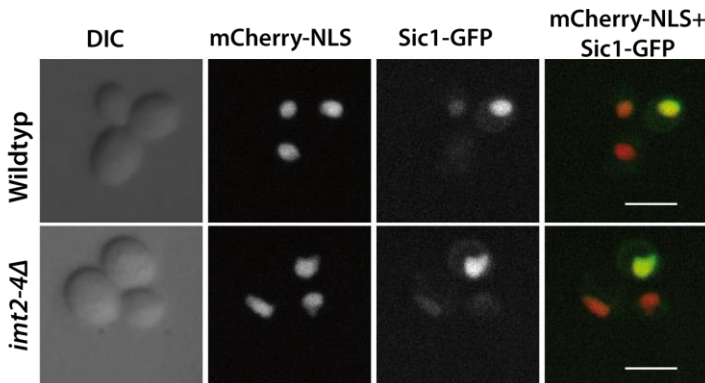
A



B



C



D

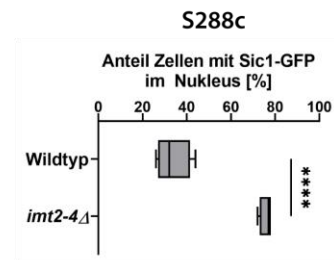


Abbildung 4-4: Mehr Sic1 positive Zellen in eIF2-Mutanten. A,C, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W15831 (*SIC1-GFP mCherry-NLS*) W15833 (*cdc123-Δ326 SIC1-GFP mCherry-NLS*) W15755 (*gcd11-Δ521 SIC1-GFP mCherry-NLS*) W15844 (*SIC1-GFP mCherry-NLS*) und W15845 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ SIC1-GFP mCherry-NLS*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm zwischen den Ebenen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B,D,** Anzahl, in Prozent, der Sic1 positiven Zellen aus A und C. Für die Auszählung wurden 4x50 Zellen verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarten t-Test. Signifikanz: *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

Im Stammhintergrund S288c konnte Sic1 sowohl im Wildtyp sowie in der *imt2-4Δ*-Mutante fast nur in Zellen ohne Knospe detektiert werden. Zellen am Ende der Mitose, kurz vor der Zytokinese, zeigten selten ein Sic1-GFP Signal. In der *imt2-4Δ*-Mutante konnte zudem mehr Sic1 positive Zellen ausgezählt werden (n= 4x50 Zellen, S288c im Wildtyp 33,5% und *imt2-4Δ* 76%, Abbildung 4-4 C-D). Der Vergleich mit den Durchflusszytometrie-Daten ergab vor allem im Wildtyp vergleichbare Werte.

Mithilfe der Durchflusszytometrie und der Lebend-Zell-Mikroskopie war es möglich, die eIF2-Mutanten weiter zu charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der Translation mehr G1-Zellen vorhanden waren, die zudem Wachstumsdefizite aufwiesen

4.1.3 Untersuchung der Zellmorphologie in eIF2-Mutanten

Die Zellgröße bzw. das Volumen der Hefezellen ist ein wichtiger Einflussfaktor für den Zellzykluseintritt (Jorgensen & Tyers, 2004). Kann der Zellzyklus aufgrund von genetischen Störungen nicht fortgesetzt werden, nehmen die Zellen weiterhin an Größe zu (Neurohr et al., 2019). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Zellen ab einer bestimmten Größe Probleme im Zellzyklus und in der Genexpression aufweisen. Zellen, die in die stationäre Phase übergehen, ändern ebenfalls ihre Morphologie (Werner-Washburne et al., 1993). Da in den eIF2-Mutanten ein verzögerter Eintritt in den Zellzyklus beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4-3), stellte sich die Frage, ob die Größe bzw. die Morphologie der Zellen in den Mutanten verändert vorliegt. Hierfür wurden im Wildtyp und in den eIF2-Mutanten ein Plasmamembran Protein, Sso1, mit GFP fusioniert und unter dem Mikroskop analysiert. Mithilfe von Image J und der Formel eines Ellipsoids (Formel 6-1) konnte das Volumen der Hefezellen berechnet werden. In den eIF2-Mutanten wird anhand der Mikroskopieaufnahmen sowie nach der Berechnung deutlich, dass die Zellen ein größeres Volumen besitzen als der Wildtyp (n=50 Zellen, W303 Volumen im Wildtyp $49,3 \mu\text{m}^3$, in *cdc123-Δ326* $73,69 \mu\text{m}^3$ und in *gcd11-Δ521* $68,7 \mu\text{m}^3$, Abbildung 4-5 A-B, im S288c Volumen im Wildtyp $42,61 \mu\text{m}^3$ und in *imt2-4Δ* $73,5 \mu\text{m}^3$, Abbildung 4-5 D-E). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis zwischen Länge und Breite im Wildtyp größer 1 war und somit auf eine ovalere Form hindeutete, wohingegen in den eIF2-Mutanten der Quotient fast 1 betrug, was mehr einer Kugel ähnelte (n=50 Zellen, W303 Quotient im Wildtyp $1,4 \mu\text{m}^2$, in *cdc123-Δ326* und in *gcd11-Δ521* $1,2 \mu\text{m}^2$, Abbildung 4-5 C, im S288c Quotient im Wildtyp $1,3 \mu\text{m}^2$ und in *imt2-4Δ* $1,1 \mu\text{m}^2$, Abbildung 4-5 F). Die Daten der Mikroskopie verdeutlichten, dass die eIF2-Mutanten einen größeren und kugelförmigeren Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp hatten.

Neben den Mikroskopieaufnahmen wurden zusätzlich die Daten aus der Durchflusszytometrie weiter untersucht. Hierbei wurde das Vorwärtstreulicht (FSC „*forward scatter*“) als Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel herangezogen. Die Beugung des Lichtes wird vom Volumen beeinflusst. Aus diesem Grund wurde der FSC in den unterschiedlichen Stämmen näher analysiert. Die FSC-Daten bestätigen die zuvor gemessenen Volumengrößen.

In den eIF2-Mutanten wird eine breitere Verteilung der FSC-Werte und somit eine Zunahme des Streulichts im Vergleich zur schmalen Verteilung des Wildtyps ersichtlich (Abbildung 4-5 G-H). Im W303 und im S288c Stammhintergrund ist der stärkste Effekt der FSC-Verteilung, wie auch bei den zuvor erhobenen Daten, in der *imt2-4Δ*-Mutante zu erkennen.

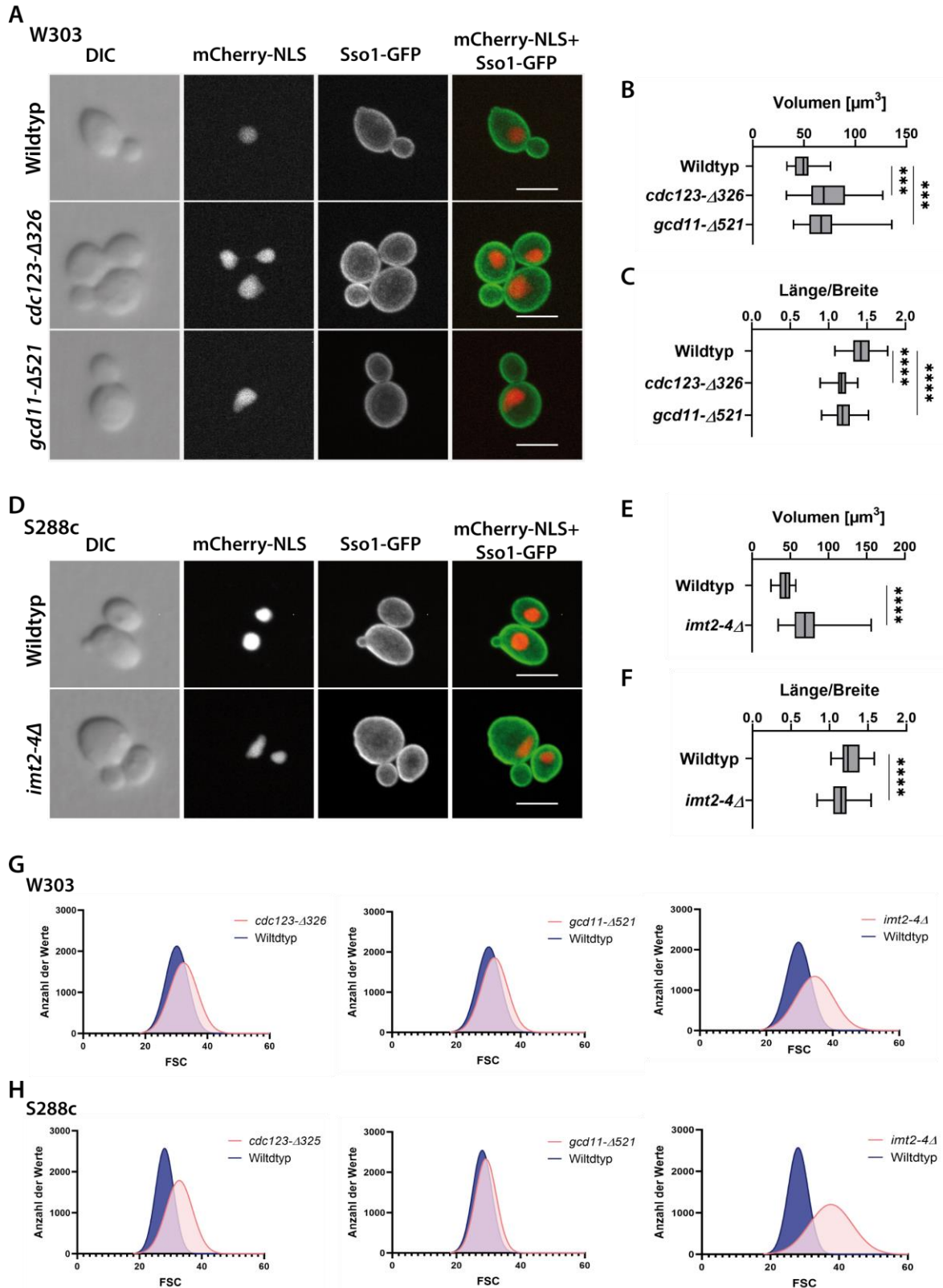


Abbildung 4-5: Veränderte Zellgröße in eIF2-Mutanten. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

A-F, Verwendete Stämme: W15827 (*mCherry-NLS pTEF2-GFP-SSO1*), W15829 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS pTEF2-GFP-SSO1*), W15769 (*gcd11-Δ521 mCherry-NLS pTEF2-GFP-SSO1*), W15373 (*mCherry-NLS pTEF2-GFP-SSO1*) und W15379 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ mCherry-NLS pTEF2-GFP-SSO1*) **A,D** Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm zwischen den Ebenen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B,E**, Volumen Messung und Berechnung von je 50 Zellen mit der Formel 6-1: $4/3\pi abc$, wobei $a=0,5x$ Länge $b=0,5x$ Breite und $c=0,5x$ Höhe entspricht. Die Höhe wurde berechnet, indem die Anzahl der Ebenen mit dem Abstand (0,6 µm) zwischen Ebenen multipliziert wurde. **C,F**: $n=50$ je Zellen, Berechnung des Quotienten Länge/Breite, ein Maß wie kugelförmig oder oval die Zellen sind. Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung durch einen ungepaarten t-Test. Lag keine Normalverteilung nach dem Shapiro-Wilk Test vor, wurde der Mann-Whitney Test herangezogen. Signifikanz: *** $p<0,0002$, **** $p<0,0001$ **G-H**, Die verwendeten Stämme K699 und BY4741 (Wildtypen) W13036 und W15766 (W303 und S288c *imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) W15596 (*cdc123-Δ326*) W16248 (*cdc123-Δ325*) W15566 und W15905 (W303 und S288c *gcd11-Δ521*) wurden für die Zellzyklus-Analyse über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „*Sytox Green*“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. 20000 Events wurden aufgenommen und die Verteilung der FSC-Werte aufgetragen, wobei eine Überlagerung des Wildtyps mit den Mutanten dargestellt ist.

Beide Analyseverfahren brachten dieselben Ergebnisse hervor, die Größe der Zellen lag in den eIF2-Mutanten verändert vor. In der Literatur wurde zuvor beschrieben, dass neben der bestimmten Größe eine kritische Rate der Proteinsynthese für den G1/S-Übergang notwendig ist (Jorgensen & Tyers, 2004; Neurohr et al., 2019; Polymenis & Aramayo, 2015). Aus den hier erhobenen Daten wird ersichtlich, dass die inhibierte Translationsinitiation nicht nur zu mehr G1-Zellen führt (Abbildung 4-3, Abbildung 4-4), sondern die Zellen auch an Volumen zunehmen (Abbildung 4-5). Erst wenn die Zellen einen Schwellenwert an synthetisierten Proteinen erreicht haben, können sie in die S-Phase eintreten. Zeitgleich wachsen die Zellen jedoch weiter.

4.1.4 Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Hefezelle

Der favorisierte Stoffwechselweg der Hefe ist die Fermentation. Die Hefe nimmt eine geeignete Kohlenstoffquelle auf, verstoffwechselt diese und produziert Ethanol (Otterstedt et al., 2004). Glukose ist die bevorzugte Kohlstoffquelle beim exponentiellen Wachstum (Galdieri et al., 2010). Obwohl Sauerstoff vorhanden ist, setzt die Hefe Glukose zu Alkohol um und gewinnt ihre Energie über die Gärung. Ist Glukose im Medium verbraucht, führt dies zu einer verminderten Wachstumsrate und einer Umprogrammierung des Stoffwechsels. Allerdings kann die Hefe auch andere Kohlenstoffquellen, wie zum Beispiel Galaktose, Raffinose oder auch Glycerin nutzen (Turcotte et al., 2010). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Glukose-Depletion zu einer Inhibierung der Translation führt (Ashe et al., 2000). Für eine weitere Charakterisierung der eIF2-Mutanten stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Kohlenstoffquelle auf das Wachstum hat. Hierfür wurden das Wachstum und der Zellzyklus in verschiedenen konzentrierter Glukose sowie in anderen Kohlenstoffquellen untersucht. Damit immer die gleiche Konzentration an Kohlstoff im Medium vorhanden war, wurde die verringerte Glukosekonzentration durch Raffinose (R) ersetzt. Neben den zwei unterschiedlichen Sacchariden (Mono- und Tri-) wurde zusätzlich noch 2% Glycerin (Gly), ein C3-Körper, welcher nicht fermentiert

werden kann, als Kohlstoffquelle eingesetzt. Für die Analyse wurde der Wildtyp und die *cdc123-Δ326*-Mutante im W303 Stammhintergrund gewählt (Abbildung 4-6 A-B). Im Wildtyp konnte erst bei 0,1% Glukose ein verringertes Wachstum festgestellt werden. Bei 2% Raffinose und Glycerin war ein stark vermindertes Wachstum im Wildtyp sichtbar. In den *cdc123-Δ326*-Zellen sah das Wachstumsverhalten sehr ähnlich aus, wobei der Unterschied zwischen 2% Raffinose und 0,1% Glukose nicht stark erkennbar war. Demnach war das verminderte Wachstum bei 2% Raffinose im Wildtyp deutlich ausgeprägter und der Unterschied auf diesen Platten zwischen Wildtyp und Mutante geringer. Bei 2% Glycerin wurde in der *cdc123-Δ326*-Mutante auch eine starke Wachstumsverminderung festgestellt (Abbildung 4-6 A oben).

Die Zellzyklus-Analysen bestätigen die Ergebnisse des Wachstumstests und zeigen deutlich, dass der stärkste Effekt im Wildtyp zwischen 2% Glukose und 2% Glycerin vorlag (Anteil an 1C-Zellen bei 2% Glukose 11% und bei 2% Glycerin 42%, Abbildung 4-6 A unten, B). In der *cdc123-Δ326*-Mutante veränderte sich der Anteil der 1C-Zellen nur geringfügig in Anwesenheit von Glukose. Bei 2% Raffinose sowie in Glycerin stieg der Anteil an 1C-Zellen jedoch verstärkt an (1C-Zellen in *cdc123-Δ326* bei 2% Raffinose 46% und bei 2% Glycerin 51%, Abbildung 4-6 A unten, B). Interessanterweise konnte im Wildtyp nach dem Wechsel auf eine nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle eine Zunahme des Anteils an 1C-Zellen um 31% detektiert werden. In der *cdc123-Δ326*-Mutante waren es jedoch nur 15%. Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Veränderung der Kohlenstoffquelle konnte im Wildtyp und in der Mutante ein vermindertes Wachstum sowie ein verspäteter Zellzykluseintritt beobachtet werden. Der Effekt war im Wildtyp stärker ausgeprägt. Der Unterschied zwischen Wildtyp und der *cdc123-Δ326*-Mutante bei 2% Glukose (25%) waren in Glycerin deutlich geringer (9%). Die Vermutung liegt nahe, dass die Kohlenstoffquelle auf den Wildtyp somit einen stärkeren Einfluss hat.

Die zuvor erhobenen Daten zeigten, dass die Abwesenheit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle im Wildtyp einen stärkeren Effekt auf den Zellzyklus hat als in der *eIF2*-Mutante (Abbildung 4-6 A-B). Es stellte sich die Frage, ob in der *cdc123-Δ326*-Mutante der Glukoseverbrauch verändert vorlag. Um mögliche Abweichungen zwischen Wildtyp und der *cdc123-Δ326*-Mutante in der Glukoseaufnahme bzw. Verstoffwechselung zu ermitteln, wurde deshalb die Glukosekonzentration im Medium über einen bestimmten Zeitraum gemessen. Hierfür wurde die Messung der Glukosekonzentration im Medium mit der Messung der optischen Zelldichte kombiniert. Im Zeitverlauf wurde stündlich eine Probe entnommen, die OD₆₀₀ gemessen, abzentrifugiert und der Überstand für die Messung der Glukosekonzentration verwendet. Die Zellen waren zu Beginn der Messung im exponentiellen Wachstum (Abbildung 4-6 C-D). Die Messung ergab, dass die *cdc123-Δ326*-Zellen über den gleichen Zeitraum weniger Glukose verbrauchten. Der Glukoseverbrauch pro Zeit bezog sich auf das vergleichbar langsamere Wachstum der *eIF2*-Mutante (Abbildung 4-6 C). Die Glukosekonzentration im Wildtyp und in der Mutante war jedoch in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ unter 1) sehr ähnlich (Wildtyp OD₆₀₀=0,8 1,13mg/ml Glukose, *cdc123-Δ326* OD₆₀₀=0,8 1,12mg/ml, Abbildung 4-6 C).

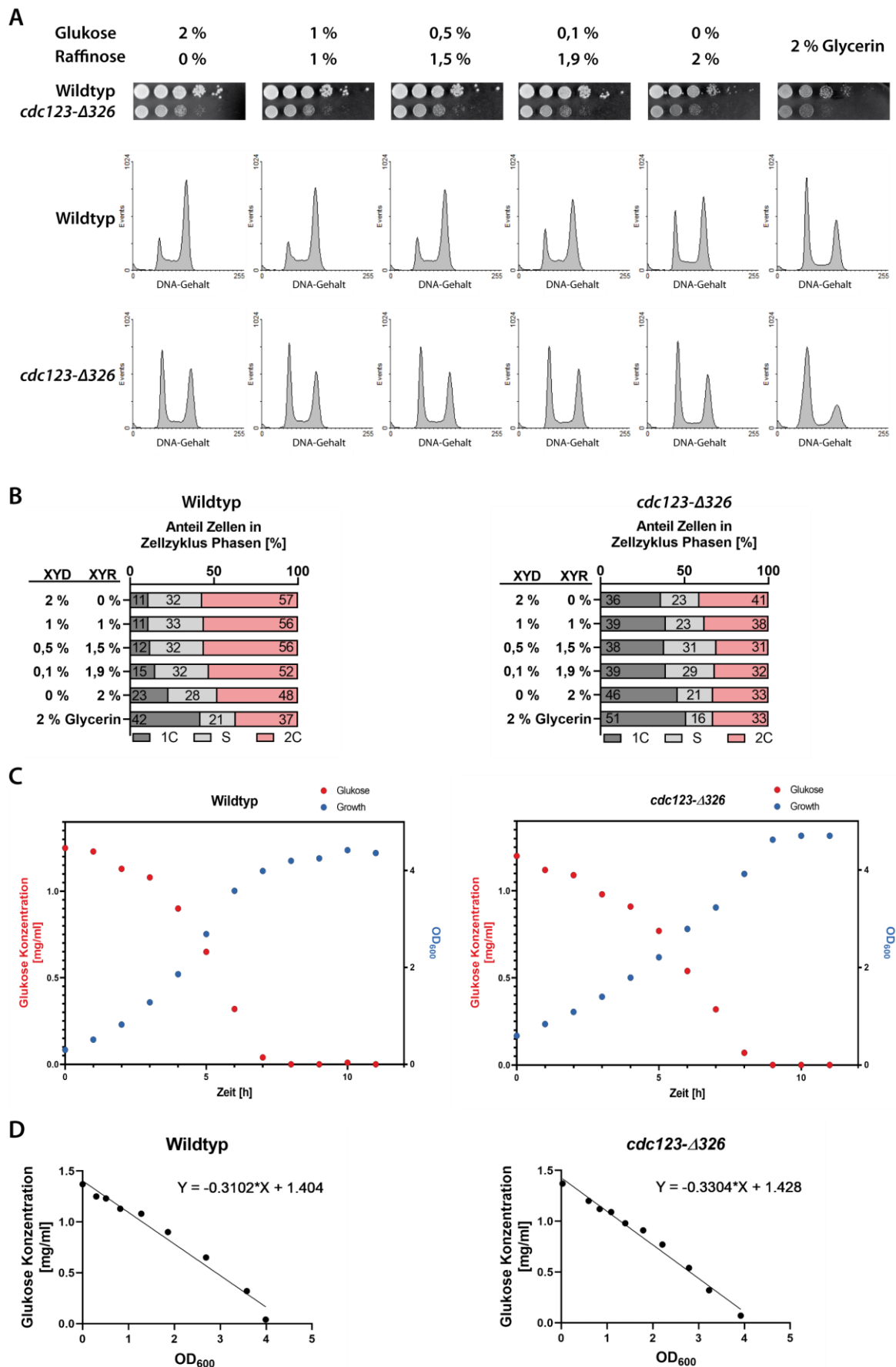


Abbildung 4-6: Analyse der Kohlstoffquelle in Wildtyp und *cdc123-Δ326*. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

Verwendete Stämme: K699 (Wildtyp) und W15596 (*cdc123-Δ326*) **A oben**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml, wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Verdünnungen wurden auf Platten mit unterschiedlicher Konzentration von Glukose (2-0%) und Raffinose (0-2%), sodass immer eine Gesamt-Kohlenstoffmenge von 2% vorlag, sowie auf Platen mit 2% Glycerin überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **A unten**, Zellzyklus-Analysen der Stämme in Medien mit der identischen Zuckerkonzentration wie beim Wachstumstest (A, oben). Zellen wurden, in den besagten Medien, über Nacht bei 25°C kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „*Sytox Green*“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusssyztometer CyFlow Space. **B**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase). **C**, Für den Glukose-Assay wurden die Zellen über Nacht in 100 ml XYD bei 25°C inkubiert, sodass sie am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase vorlagen. Daraufhin wurde jede Stunde (12x) 500 µl entnommen, die OD₆₀₀ gemessen, die Proben zentrifugiert und den Überstand bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurde der Glukose-Assay (Megazym) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei A₅₁₀ und mittels Standardkurve konnte die Glukosekonzentration berechnet werden. Die Konzentration (mg/ml, links) und das Wachstum (OD₆₀₀, rechts) ist über der Zeit (h) aufgetragen. **D**, Andere Darstellung der Daten, um die Abnahme der Glukosekonzentration in Abhängigkeit des Wachstums zu analysieren. Eine Trendlinie wurde durch die Punkte gezogen. Die Steigung der Geraden (Wildtyp: -0,3102; *cdc123-Δ326*: -0,3304) gibt Information über die Glukose Abnahme im Medium.

Für die weitere Analyse des Glukoseverbrauchs im Wildtyp und in der *cdc123-Δ326*-Mutante wurde die im Medium vorhandene Glukosekonzentration auf das Wachstum der Zellen bezogen und eine Trendlinie in den Graphen eingefügt (Abbildung 4-6 D). Es konnte in beiden Genotypen festgestellt werden, dass, in Bezug auf die optische Zelldichte, die Glukose im Medium etwa gleich schnell verstoffwechselt wird. Kein veränderter Glukoseverbrauch konnte somit in der eIF2-Mutante festgestellt werden.

Im Wildtyp hatte die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle, Glycerin, einen größeren Einfluss auf den Zellzykluseintritt als auf die eIF2-Mutante. Eine Hypothese wäre, dass die Mutante Glukose nicht so gut verstoffwechselt kann wie der Wildtyp. Um zu untersuchen, ob die eIF2-Mutante einem Wildtyp, der keine fermentierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung hat, ähnelt, wurden weitere Analysen durchgeführt. Der Wildtyp wurde hierfür in Glukose und in Glycerin untersucht. Neben des Zellzyklus-Effekts, der in Glycerin auftrat (vgl. Abbildung 4-6), konnte auch vermehrt Zellen mit einem Sic1-Signal im Nukleus in XXGly ausgezählt werden (n=4x50 Zellen, Wildtyp XYD 43% und in XYGly 65% Zellen mit Sic1 im Nukleus, Abbildung 4-7 A-B). Auch hier wurde die Sic1 positive Zellen in der späten Mitose detektiert, weshalb sich der ausgezählte Wert von dem 1C-Wert unterschied. Zellen, die mit Glycerin wachsen, liegen demnach vermehrt in der G1-Phase vor.

Das Volumen dieser Zellen war, wie auch schon bei den eIF2-Mutanten, vergrößert (vgl. 4.1.2). Dies wurde mit der Verteilung der FSC-Daten und auch mit dem Sso1 Marker ermittelt (n=50 Zellen, Volumen Wildtyp in XYD 49,3 µm³ und XYGly 58,6 µm³, Abbildung 4-7 C-E). Ebenfalls auffällig, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie bei den eIF2-Mutanten, waren die kugelförmigen Zellen in Glycerin, die sich aus dem Quotienten Länge dividiert durch die Breite ergab (n=50 Zellen Wildtyp XYD 1,4 µm² XYGly 1,3 µm² Abbildung 4-7 F).

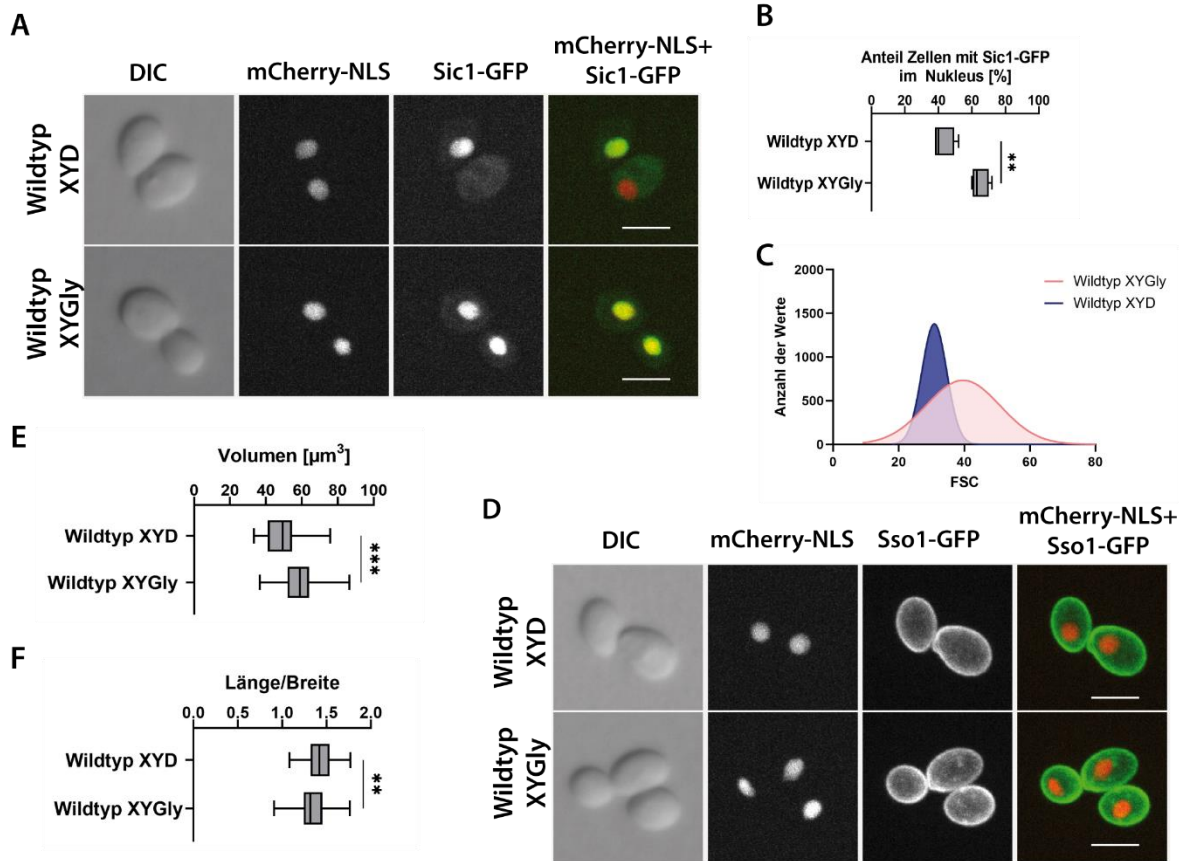


Abbildung 4-7: Einfluss von Glycerin auf Zellzyklus Eintritt und Morphologie. **A**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurde W15831 (*SIC1-GFP mCherry-NLS*) über Nacht bei 25°C in XYD und XYGly angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SGly++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm , zwischen den Ebenen, verwendet. **B**, Anzahl, in Prozent, der Sic1 positiven Zellen aus A. Für die Aufzählung wurden 4x50 Zellen genommen. Maßstabsbalken entspricht 5 μm . **C**, Für die Zellzyklus-Analyse wurde der Stamm K699 (Wildtyp) über Nacht bei 25°C in XYD und XYGly kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. 20000 Events wurden aufgenommen und die Verteilung der FSC Werte aufgetragen, wobei eine Überlagerung des Wildtyps mit den Mutanten dargestellt ist. **D**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurde der Stamm W15827 (*mCherry-NLS pTEF2-GFP-Sso1*) bei 25°C über Nacht in XYD und XYGly angezogen. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SGly++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm , zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **E**, Volumen Messung und Berechnung von je 50 Zellen wie in Abbildung 4-5 B. **F**, n=50 Zellen, Berechnung des Quotienten Länge/Breite. Ein Maß wie rund oder oval die Zellen sind. Die statistische Auswertung in B,E,F erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarten t-Test. Signifikanz: ** $p < 0,0003$ *** $p < 0,0002$.

Die eIF2 α -Phosphorylierung kann, nachdem Glukose verbraucht ist, durch die Snf1-Kinase induziert werden (Cherkasova et al., 2010; vgl. Abbildung 3-12). Wie schon zuvor beschrieben, führt die Phosphorylierung der α -Untereinheit zu einer erhöhten *GCN4*-Translation gefolgt von einem Anstieg des Transkriptionslevels (Albrecht et al., 1998; Hinnebusch, 1985; Grundmann et al., 2001). Da in den eIF2-Mutanten eine erhöhte *GCN4* mRNA-Menge detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 4-2 D), stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor auch durch Glukose beeinflusst wird. Neben der *GCN4*-Menge wurde auch die Menge von *XBP1*, eine

Positivkontrolle, untersucht. *XPB1* codiert für einen globalen Transkriptionsrepressor, der, nachdem Glukose aufgebraucht ist, verstärkt exprimiert wird (Miles et al., 2013). Der Repressor Xbp1 inhibiert die Transkription von *Cln3* und nach Überexpression von *XPB1* wachsen die Zellen langsamer und liegen vergrößert vor (Mai & Breeden, 1997). Für die Analyse wurde der Wildtyp mit Glukose oder mit Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogen und die mRNA isoliert und mittels qPCR quantitativ bestimmt. In Glycerin konnte ein Anstieg der mRNA-Menge von *GCN4* und *XPB1* im Vergleich zu Medium mit Glukose festgestellt werden (log2 Veränderungen Glycerin im Vergleich zu Glukose, *GCN4* 0,9 und *XPB1* 7,5x, Anhang Abbildung 10-1). Es war demnach möglich, in Medium mit Glycerin eine erhöhte *GCN4*-Menge zu detektieren. Etwa eine vergleichbar hohe Expression wie in den eIF2-Mutanten. Die Effekte der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle auf den Wildtyp sind denen von den eIF2-Mutanten sehr ähnlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den eIF2-Mutante die Verstoffwechselung der Glukose verändert vorliegt.

Zusammengenommen ergaben die Charakterisierung der eIF2-Mutanten viele unterschiedliche Effekte im Vergleich zum Wildtyp. Neben der erhöhten *Gcn4*-Menge wuchsen die Mutanten schlechter und mehr Zellen lagen in der G1-Phase vor (Abbildung 4-2, Abbildung 4-3). Die Störung der Translationsinitiation führte außerdem zu einer größeren und kugelförmigen Zellmorphologie (Abbildung 4-5). Die Mutanten verbrauchten pro Zunahme der Zelldichte die gleiche Menge an Glukose wie der Wildtyp (Abbildung 4-6). Beim Vergleich der eIF2-Mutante mit dem Wildtyp, der mit einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wuchs (Abbildung 4-7), kam jedoch die Vermutung auf, dass in den Mutanten die Glukose-Verstoffwechselung verändert vorliegt.

4.2 Analyse von mRNAs vor und während der Translation

Im ersten Kapitel erfolgte die physiologische Charakterisierung der in der Arbeit eingesetzten Mutanten. Die untersuchten eIF2-Mutanten sind in ihrer Funktion unterschiedlich stark beeinträchtigt. In allen Mutanten führte die Translationsinitiationsstörung zu einer Zellzyklus-Verschiebung. In den folgenden Kapiteln soll daher das Translatom und das Transkriptom näher untersucht werden. Für das Translatom wurden Polysomen-assoziierte mRNAs über einen Zuckergradienten aufgetrennt, die Fraktionen isoliert und Polysomen-Profile der Mutanten und des Wildtyps analysiert. Geeignete Fraktionen der Polysomen-Profile wurden sequenziert, um Translationseffizienzen von mRNAs zu untersuchen. Für die Transkriptom-Analyse wurde die Gesamt-RNA des Wildtyps sowie der eIF2-Mutanten isoliert und ebenfalls sequenziert. Hier konnten die mRNAs untersucht werden, die in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert wurden bzw. stark reprimiert vorlagen. Durch geeignete Analyseverfahren wie der Gene-Ontology konnten Cluster detektiert werden. Die gefundenen Gruppen wurden daraufhin für weitere Analyse herangezogen.

4.2.1 Verändertes Translationsprofil in eIF2-Mutanten

Eine weitverbreitete Technik zur Untersuchung von translatierten mRNAs, ist die Polysomen-Profil-Analyse (Pospíšek & Valášek, 2013). Während der Translationsinitiation binden zunächst die ribosmale 40S-Untereinheiten die mRNA (Jackson et al., 2010). Nachdem das Startcodon erkannt wurde, erfolgt die Anlagerung der 60S-Untereinheit. Durch die Bildung des 80S-IK (Initiationskomplex) wird die Translationselongation eingeleitet. Ist der vordere Teil der mRNA nicht mehr durch den Komplex besetzt, kann eine neue Initiation erfolgen. Auf einer mRNA können deshalb mehrere Ribosomen in Form von Polysomen assoziiert sein (Von Der Haar, 2012). Im Mittel kann nach je 60 Codons ein Ribosom vorgefunden werden (Shah et al., 2013). Durch die Polysomen-Profil-Analyse ist es möglich, die Translationseffizienz der mRNAs zu bestimmen (Pospíšek & Valášek, 2013). So steigt zum Beispiel der Anteil der Monosomen assoziierten mRNAs bei einer Störung der Translationsinitiation. Die Anzahl der Polysomen nimmt hingegen ab. In den eIF2-Mutanten liegt eine Störung der Translationsinitiation vor. Mithilfe der Polysomen-Profil-Analyse soll untersucht werden, ob sich die Profile der eIF2-Mutanten vom Wildtyp unterscheiden. Hierfür musste zunächst die Methode etabliert werden. Im ersten Schritt erfolgt die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (Chx), wodurch die Translationselongation inhibiert wird. Die Ribosomen verharren daraufhin auf der mRNA. Durch das Beladen der behandelten Zellen auf einen Saccharose-Gradienten (10-50%) und darauffolgender Ultrazentrifugation werden die mit unterschiedlich vielen Ribosomen beladenen mRNAs aufgetrennt (Pospíšek & Valášek, 2013). Gut translatierte mRNAs sind mit vielen Ribosomen besetzt und können nach der Zentrifugation in einer hohen Saccharosekonzentration gefunden werden (vgl. Abbildung 6-4). Der selbst hergestellte Zuckergradient wurde mit 800 µg RNA, vom Wildtyp und den eIF2-Mutanten, beladen. Nach der Ultrazentrifugation für 3 h bei 4°C erfolgte die weitere Auftrennung über ein Äkta System.

Für die Untersuchung wurden im Stammhintergrund S288c neben dem Wildtyp die Stämme mit den Genotypen *imt2-4Δ*, *gcn4Δ* und *gcn4Δ imt2-4Δ* analysiert. In Abbildung 4-8 A-C sind die entstandenen Profile des S288c Stammhintergrunds dargestellt. Beim Vergleich zwischen Wildtyp und der *imt2-4Δ*-Mutante wird deutlich, dass in der Mutante der Monosomen-Peak höher und die Peaks der Polysomen flacher waren (Abbildung 4-8 A-B). Gleiches konnten in der *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante detektiert werden (Abbildung 4-8 C). In beiden Ansätzen war in den eIF2-Mutanten der Disomen-Peak eine Schulter des Monosomen-Peaks und die RNA-Konzentration in den Polysomen war deutlich geringer als im Wildtyp bzw. in *gcn4Δ*.

Im Stammhintergrund W303 wurde der Wildtyp sowie die Stämme *cdc123-Δ326* und *gcd11-Δ521* untersucht (Abbildung 4-8 D). Auch in diesen Profilen wird ein deutlich erhöhter 80S-Peak detektiert. Die mRNA in den Polysomen-Peaks lag geringer konzentriert vor als im Wildtyp. Anhand der Polysomen-Profile wird deutlich, dass in allen eIF2-Mutanten die Translation gestört vorliegt. Im Vergleich zum Wildtyp konnte ein höherer Monosomen-Peak und geringere Polysomen-Peaks detektiert werden.

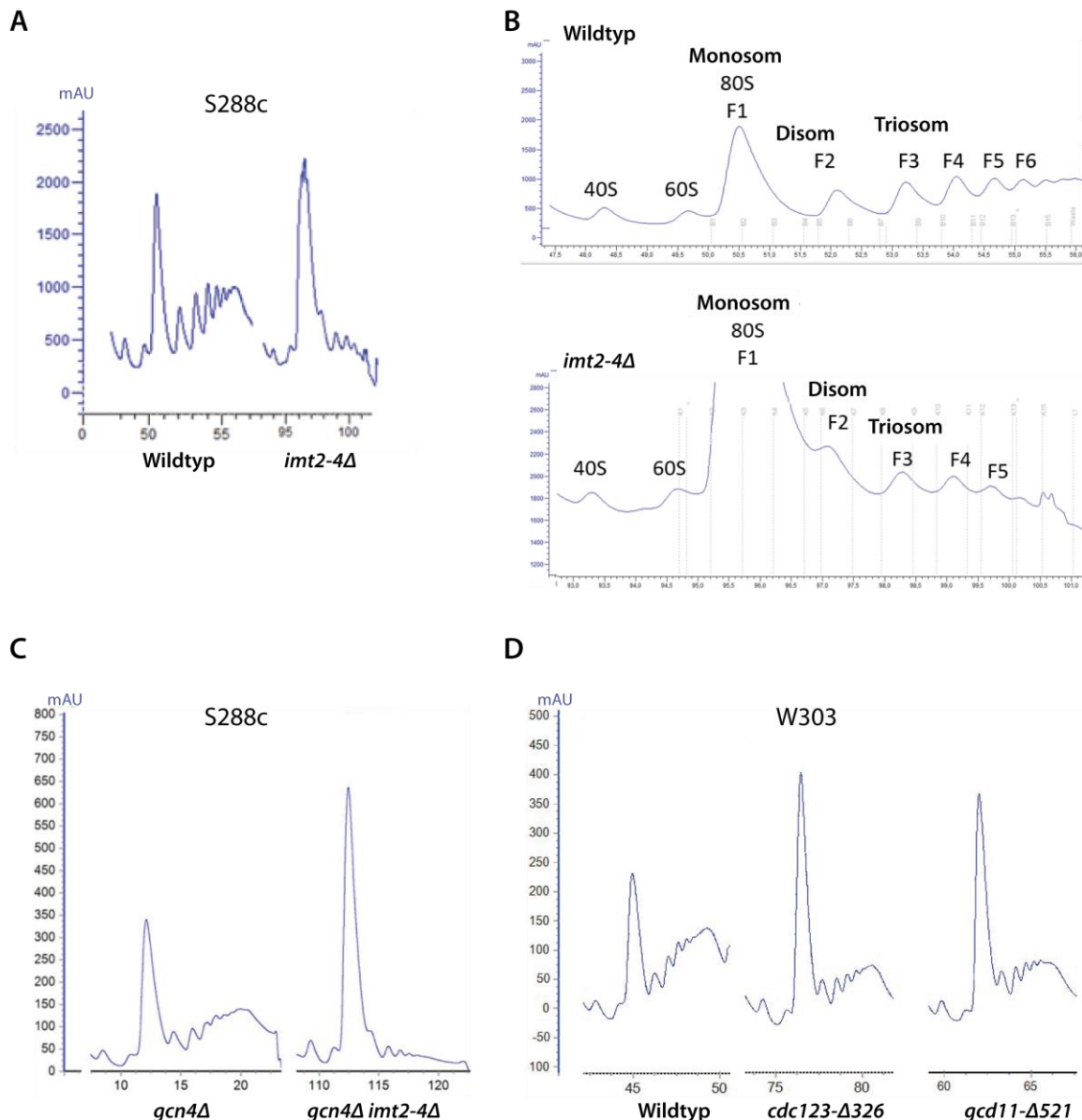


Abbildung 4-8: Polysomen-Profile der eIF2-Mutanten. Die Stämme aus **A**, BY4741 (Wildtyp) und W13036 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) aus **C**, W9057 (*gcn4Δ*) und W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*) und aus **D**, K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*) und W15566 (*gcd11-Δ521*) wurden nach einer Vorkultur über Nacht bei 25°C inkubiert. 52,5 OD₆₀₀ der exponentiell wachsenden Kultur (ca. 0.7 OD₆₀₀) wurden geerntet, in Cycloheximid Lysispuffer resuspendiert und mechanisch aufgeschlossen. Die RNA-Konzentration wurde im Zelllysats bestimmt und 800 µg je Probe auf einen Saccharose-Gradienten geladen. Die beladenden Gradienten wurden für 3 h bei 35000 rpm in der Ultrazentrifuge (Thermo Scientific Sorvall WX Ultra Serie, Rotor TH641) zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte mittels einer Äkta. Die detektierten Fraktionen (F1-F6) wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt und über Nacht gefällt. Reaktionsgefäße einer Fraktion wurden daraufhin zusammengeführt und die RNA mittels Phenol Chloroform Methode isoliert. In **B**, sind die Fraktionen der Stämme aus A vergrößert dargestellt und die ribosomalen-Untereinheiten und die Menge an RNA assoziierten Ribosomen gekennzeichnet. Aufgetragen ist auf der y-Achse mAU (*Absorbance Units*), gemessen wurde bei A₂₆₀ nm und auf der x-Achse aufgetragen ist das Volumen in ml, welches durch das Äkta System gelaufen ist.

Der Transkriptionsfaktor *GCN4* wird nach Störung der Translationsinitiation verstärkt translatiert (Gebauer & Hentze, 2004; Pavitt, 2005; Proud, 2005). Dies wurde auch in den eIF2-Mutanten detektiert (vgl. Abbildung 4-2). Da die Translationseffizienz von *GCN4* in den Mutanten

verstärkt vorliegt, kann der Transkriptionsfaktor als Positivkontrolle für eine Validierung der Methode herangezogen werden. Hierbei stellte sich die Frage, in welcher Polysomen-Fraktion der Mutanten die höchste *GCN4*-Menge detektiert werden kann. Hierfür wurden die Fraktionen (F1-F6) vom Wildtyp und der *imt2-4Δ*-Mutante aus dem S288c Stammhintergrund gesammelt (Abbildung 4-8 B). Daraufhin wurde die RNA isoliert und nach reverser Transkription, die Quantität von *GCN4* im Wildtyp und in der *imt2-4Δ*-Mutante bestimmt. Als Referenz-Gen wurde *ACT1* herangezogen. Neben der isolierten mRNA aus den Fraktionen wurde zusätzlich die Gesamt-RNA isoliert und analysiert. Dadurch war es möglich, die *GCN4*-Menge aus den Fraktionen auf die Gesamtmenge zu beziehen und die Translationseffizienz zu untersuchen.

In Abbildung 4-9 sind unterschiedliche Varianten der Normierung aufgetragen. Im Wildtyp konnte, im Vergleich zur Gesamtmenge, am meisten *GCN4* in F1 und F2 detektiert werden (Abbildung 4-9 A). In den weiteren Fraktionen nahm die Menge ab. Auch in der *imt2-4Δ*-Mutante nahm die *GCN4*-Menge über den Gradienten ab, jedoch konnte hier in F2 die höchste Menge an *GCN4* detektiert werden (Abbildung 4-9 A). Wird die *GCN4*-Menge über die unterschiedlichen Fraktionen hinweg betrachtet und auf die Monosomen-Fraktion normiert, wurde deutlich, dass im Wildtyp die höchste *GCN4*-Menge in den Monosomen finden war. Die Menge nahm in den anderen Fraktionen stetig ab. In der *imt2-4Δ*-Mutante wurde eine stark erhöhte *GCN4*-Menge in der Disomen-Fraktion detektiert. In den weiteren Fraktionen nahm die Menge ebenfalls ab (Abbildung 4-9 B). Der direkte Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante in jeder Fraktion lieferte ein deutliches Ergebnis. In F1 konnte nur eine leicht erhöhte Menge von *GCN4* in der *imt2-4Δ*-Mutante detektiert werden (Veränderung *imt2-4Δ* bezogen auf Wildtyp $\log_2$ 0,18). In der zweiten Fraktion war der klarste Unterschied zu erkennen (Veränderung *imt2-4Δ* bezogen auf Wildtyp $\log_2$ 2,9). Auch in den weiteren Fraktionen war deutlich mehr *GCN4* in der *imt2-4Δ*-Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, vorhanden (Abbildung 4-9 C).

Um nicht nur die relativen Zahlen zu betrachten, wurden die absoluten C_T -Werte von Wildtyp und von *imt2-4Δ* direkt verglichen (Abbildung 4-9 C). Der direkte Vergleich der C_T -Werte sollte veranschaulichen, dass sich auch die *ACT1*-Menge über den Gradienten hinweg zwischen Wildtyp und *imt2-4Δ* unterschied. So konnte in Fraktion 2 und 6 weniger *ACT1* in der *imt2-4Δ*-Mutante ermittelt werden (Abbildung 4-9 D). In Fraktion 4 und 5 hingegen war in *imt2-4Δ* die *ACT1*-Menge im Gegensatz zum Wildtyp erhöht. Bei der Betrachtung des Schwellenwertes (C_T) von *GCN4* wurde deutlich, dass in jeder Fraktion der C_T -Wert in der *imt2-4Δ*-Mutante früher erreicht wurde als im Wildtyp, vor allem in Fraktionen F3 bis F6. Die relativ hohen *GCN4*-Mengen in der *imt2-4Δ*-Mutante der zweiten Fraktion lassen sich durch die stark verringerten absoluten *ACT1*-Werte der selben Fraktion erklären (Abbildung 4-9 C-D). Die *ACT1*-Menge im Wildtyp und in der *imt2-4Δ*-Mutante waren in F3 identisch, die *GCN4*-Menge in der Mutante jedoch deutlich erhöht ($\log_2$ 1,5 Abbildung 4-9 C-D). Die Betrachtung der absoluten Werte ist jedoch problematisch, da alle Proben, die miteinander verglichen werden, genau die gleiche Konzentration haben müssen.

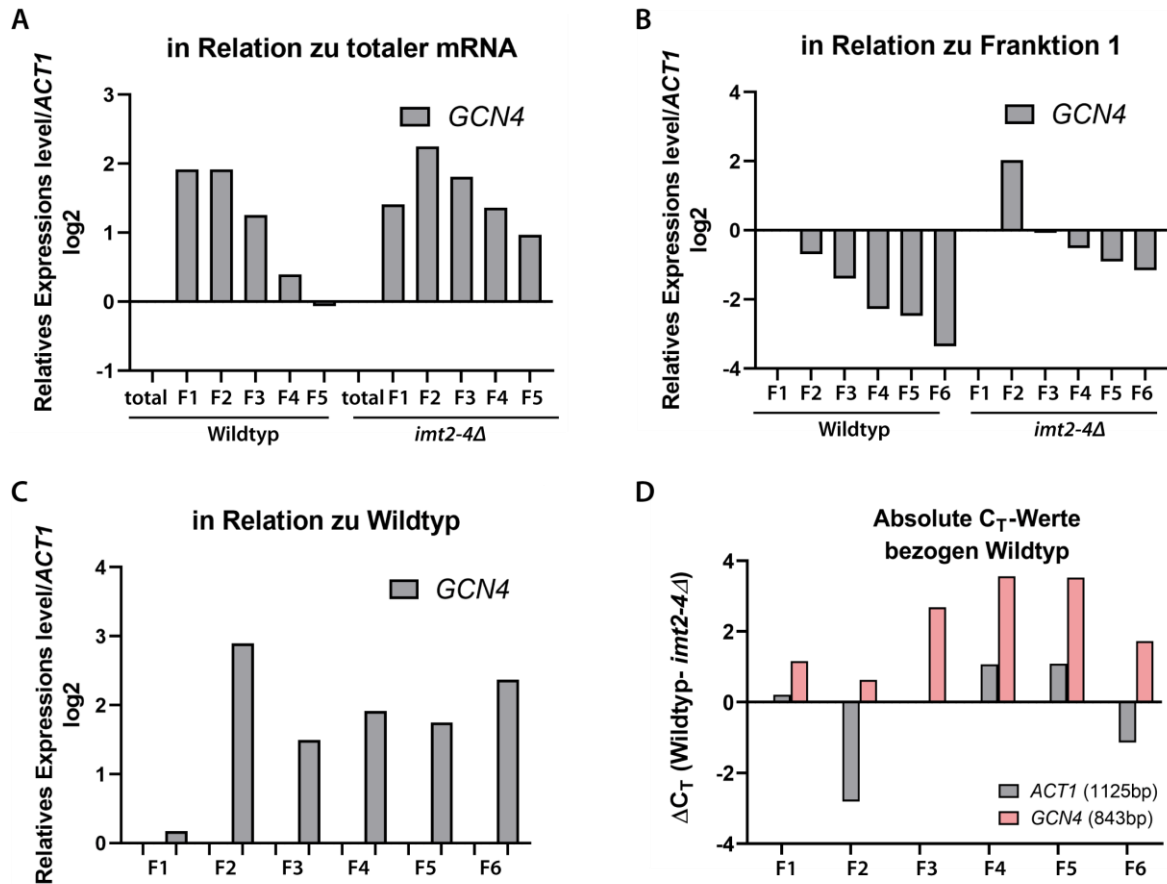


Abbildung 4-9: Untersuchung von *GCN4* in den Polysomen-Fractionen. Für die Isolation der Gesamt-mRNA wurden die Stämme BY4741 (Wildtyp) und W13036 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert, die exponentiell wachsenden Zellen geerntet und mit der Phenol Chloroform Methode isoliert. Für die Polysomen-assoziierte mRNA wurden die aus dem Äkta System gesammelten Reaktionsgefäße der einzelnen Fraktionen zusammengeführt und ebenfalls die mRNA mit der Phenol Chloroform Methode isoliert. Für die cDNA Synthese wurde 50 ng RNA eingesetzt. Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Rotor-Gene Q (Qiagen), wobei „SYBR Green“ als DNA interkalierender Farbstoff eingesetzt wurde. Als Referenz-Gen wurde Aktin (*ACT1*) herangezogen **A-C**, Die *GCN4*-Menge wurde auf *ACT1* normalisiert. Aufgetragen sind die log2 Werte **A**, Die normalisierten Werte wurden auf die *GCN4* Gesamt-mRNA-Menge bezogen. **B**, Die normalisierten Werte wurden auf die *GCN4*-Menge der ersten Fraktion (F) bezogen. **C**, Die normalisierten Werte jeder Fraktion von *imt2-4Δ* wurden auf normalisierte Werte jeder Fraktion des Wildtyps bezogen. **D**, Sind die ΔC_T -Werte (C_T Wildtyp- C_T *imt2-4Δ*) von *ACT1* und *GCN4* aufgetragen. Werte die größer als 1 sind, sind in *imt2-4Δ* quantitativ mehr, alles was kleiner 0 ist, erreicht im Wildtyp früher den Schwellenwert und ist somit mehr im Wildtyp vorhanden. total= Gesamt-mRNA.

Die Validierung der Methode ergab, dass in allen Polysomen-Fractionen der Mutante eine höhere *GCN4*-Menge im Vergleich zum Wildtyp vorlag. Dies bestätigt erneut eine verstärkte Translation von *GCN4* in den eIF2-Mutanten. Diese Methode kann zudem herangezogen werden, um Translationseffizienz von anderen mRNAs zu untersuchen. Allerdings sollten die absoluten Werten immer mitbetrachtet werden, da sich die Referenzprobe ebenfalls über den Gradienten hinweg verändert.

Zusammenfassend ergaben die Analysen ergaben, dass die Störung der Translationsinitiation zu einem veränderten Polysomen-Profil führt. In den eIF2-Mutanten war der Monosomen-Peak deutlich höher als im Wildtyp. Die assoziierten Polysomen nahmen in den eIF2-Mutanten im

Vergleich zum Wildtyp stärker ab. Die höchste in den *imt2-4Δ*-Mutanten gemessene *GCN4*-Menge konnte in der F2 nach der Normalisierung detektiert werden. In allen weiteren Fraktionen konnte ebenfalls in der *imt2-4Δ*-Mutante eine höhere *GCN4*-Menge im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. In der Translationsinitiationsmutante war eine erhöhte *GCN4*-Translationseffizienz feststellbar (Abbildung 4-9 C). Dies bestätigt die in der Literatur erhobenen Daten (Hinnebusch, 2005).

4.2.2 Transkriptionsmuster in eIF2-Mutanten

Im Laufe der letzten Jahre wurde immer häufiger Transkriptionsveränderungen in der Bäckerhefe untersucht. Solche Transkriptom-Analysen wurden zunächst mithilfe von „*microarrays*“ durchgeführt (Dong et al., 2017; Oszlak & Milos, 2011). Die Entwicklung des „*next-generation sequencing*“ brachte eine neue Möglichkeit der genomweiten Analysen hervor. Durch die Hochdurchsatz-mRNA-Sequenzierung (RNA-Seq) können Veränderungen der Transkriptionsmuster in unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden. In den eIF2-Mutanten war es möglich, mithilfe der Polysomen-Profil-Analyse, ein verändertes Translationsprofil zu ermitteln. Es stellte sich demnach die Frage, welche Auswirkung die inhibierte Translationsinitiation auf das Transkriptom sowie auf das Translatom hat. Um eine genomweite Veränderung in den eIF2-Mutanten zu untersuchen, wurde die Gesamt- sowie Polysomen-assoziierte RNA für das RNA-Seq verwendet. Für das RNA-Seq wurde im S288c Stammhintergrund der Wildtyp und die Mutanten *imt2-4Δ*, *gcn4Δ* und *gcn4Δ imt2-4Δ* ausgewählt. Neben der Gesamt-RNA wurde aus allen Genotypen die F3 des Polysomen-Profiles isoliert und sequenziert (vgl. Abbildung 4-8 A-C). Aus den Zellen mit der zusätzlichen *GCN4*-Deletion wurde außerdem die F6 verwendet. Im Stammhintergrund W303 wurde die Gesamt-RNA vom Wildtyp und den Mutanten *imt2-4Δ*, *cdc123-Δ326* und *gcd11-Δ521* sequenziert. Des Weiteren wurde die vereinigten Fraktionen F4 und F5 der Polysomen-assoziierten mRNAs vom Wildtyp, *cdc123-Δ326* und *gcd11-Δ521* für das RNA-Seq genutzt (vgl. Abbildung 4-8 D). Von allen hier aufgeführten Proben für das RNA-Seq wurden je drei Replikate angefertigt und verwendet. Die ausgewerteten Daten sind auf einer CD angefügt (siehe Anhang 10.1).

Für das RNA-Seq mussten die Proben zunächst aufgearbeitet werden, dies sowie die Sequenzierung erfolgte durch das Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik in Regensburg. Die mRNA wurde dort zunächst über den PolyA-Schwanz angereichert. Nach einer Fragmentierung der mRNA und reversen Transkription wurde ein am 3'-Ende adenylierter Index-Adapter ligiert. Durch eine PCR-Anreicherung wurde im letzten Schritt die cDNA „*Library*“ präpariert. Die Sequenzierung erfolgte über den HiSeq1000, wobei in eine Richtung 50 bp sequenziert wurden (50 „*single reads*“). Die Auswertung wurde mit der Unterstützung der Arbeitsgruppe Meister und Längst durchgeführt. Hierbei wurden die Rohdaten gegen das Hefegenom kartiert, die Qualität analysiert und die Menge der „*Reads*“ (wie oft ein Fragment abgelesen wurde), für

jedes Gen gezählt. Mithilfe von DeSeq2 konnte die statistische Auswertung inklusive Normierung durchgeführt werden. Für die grafische Darstellung der normierten Werte wurde „R-Studio“ und „GraphPad Prism 8“ herangezogen.

In Abbildung 4-10 A ist die Qualität der Sequenzierexperimente abgebildet. Hierbei werden die stärksten voneinander abweichenden Gene (500 Gene) dargestellt (Hauptkomponenten-Analyse). Im Experiment war deutlich zu erkennen, dass die Replikate untereinander sehr eng zusammenlagen, wohingegen die unterschiedlichen Konditionen, Gesamt- und Polysomen-assoziierte mRNA sowie Wildtyp und *imt2-4Δ*, im Plot verstreut vorlagen. Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Qualität der Proben. Die Hauptkomponenten-Analyse wurde auch in den anderen zwei Experimenten durchgeführt (Anhang Abbildung 10-2 A-B). Im Experiment mit dem W303 Stammhintergrund wurde festgestellt, dass bei jedem Genotyp ein Replikat der Gesamt-RNA immer von den anderen zwei abwich. Die abweichenden Proben wurden an einem anderen Tag, als die beiden anderen, präpariert. Bei den weiteren Analysen wurde auf die Signifikanz der Veränderungen zwischen Wildtyp und eIF2-Mutante geachtet, die trotz Abweichung der einen Probe meistens sehr deutlich war.

Mithilfe eines „volcano-plots“ wird die statistische Signifikanz, der p-Wert, gegen die log2-Werte aufgetragen. Die log2-Werte sind die Veränderungen der einzelnen mRNAs von Wildtyp und Mutante. Durch diese Visualisierung wird deutlich, welche mRNAs stark verändert vorliegen und auch gleichzeitig statistisch signifikant sind. Mit diesem Plot konnte erneut die gute Qualität der Proben dargestellt werden, da die meisten Veränderungen signifikant vorlagen (Abbildung 4-10 B). Zusätzlich wurde ersichtlich, dass einige Transkripte stärker in der *imt2-4Δ*-Mutante exprimiert vorlagen (Werte größer 1).

Eine „Heatmap“ kann herangezogen werden, um eine Übersicht von den am stärksten veränderten mRNAs, in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, zu erhalten. Hier wird die veränderte Expression der mRNAs (log2-Werte) in unterschiedlichen Farben dargestellt. In Abbildung 4-10 C ist eine „Heatmap“ der Gesamt-RNA von Wildtyp und der *imt2-4Δ*-Mutante abgebildet. Bei der Betrachtung der mRNAs, die in der *imt2-4Δ*-Mutante erhöht exprimiert vorlagen, war auffällig, dass die meisten Gene Gcn4-Targets waren. Dies bestätigt die zuvor erhobenen Daten. GCN4 wird in den Mutanten verstärkt translatiert wodurch die Zielgene von Gcn4 besser transkribiert werden. Zudem konnten mRNAs gefunden werden, die in der Mutante viel schwächer exprimiert vorlagen. Des Weiteren lagen paarungstypspezifische Gene in Wildtyp und *imt2-4Δ* verändert vor (Daten nicht im Plot). In der Analyse des S288c Stammhintergrundes besaßen die beiden Genotypen (Wildtyp und *imt2-4Δ*) zusätzlich einen anderen Paarungstyp.

Um eine direkte Veränderung der mRNAs zwischen Wildtyp und Mutante zu betrachten, kann ein Scatterplot herangezogen werden. In so einem Streudiagramm können unterschiedliche Werte von zwei Variablen betrachtet werden. Hier werden die normalisierten „Reads“ der Mutante gegen die des Wildtyps aufgetragen (Abbildung 4-10 D).

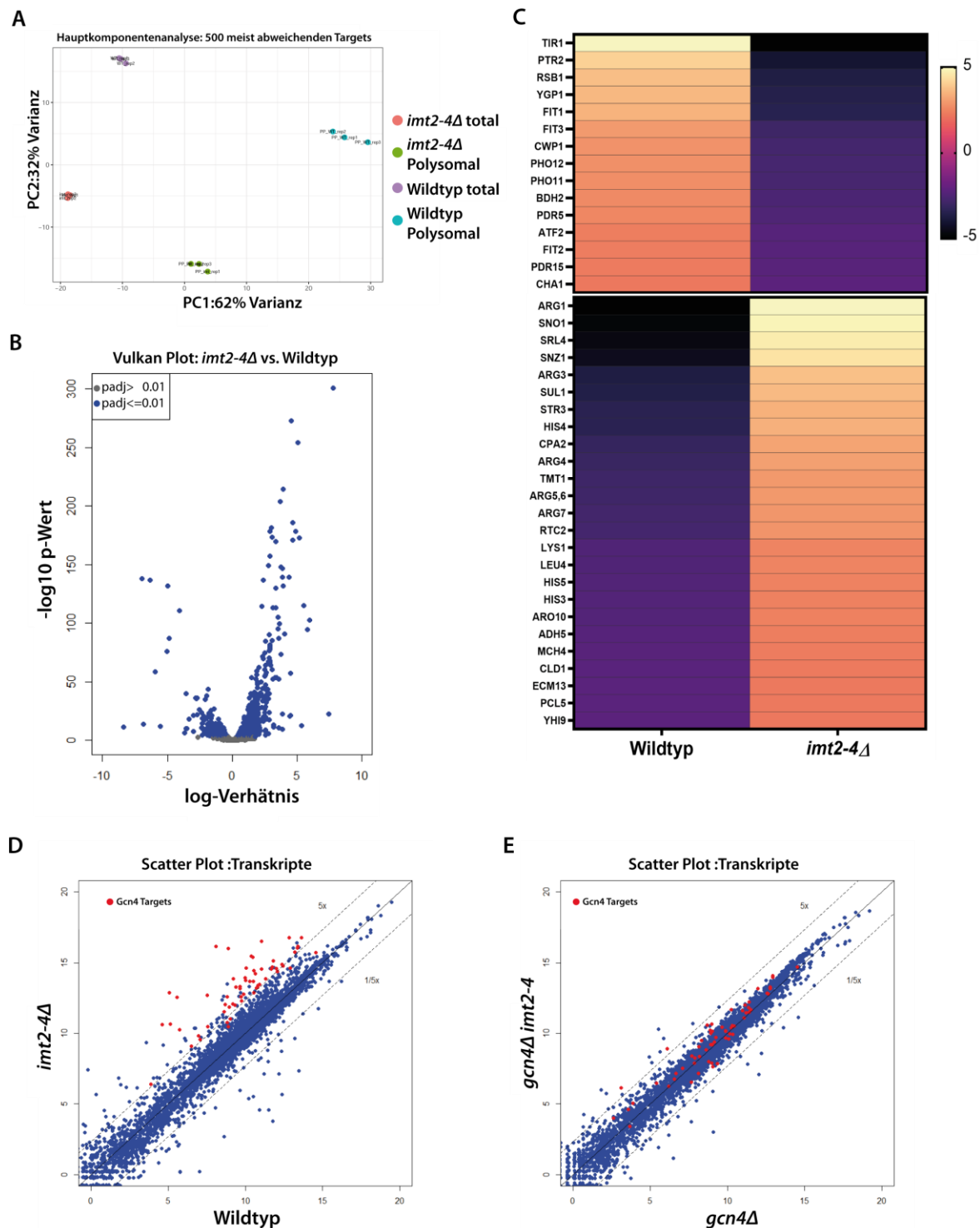


Abbildung 4-10: Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten. Stämme in **A-D** BY4741 (Wildtyp) und W13036 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*). **A**, Hauptkomponenten-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten. Dargestellt sind die 500 am stärksten veränderten mRNAs der unterschiedlichen Genotypen, sowohl polysomale- und auch Gesamt-mRNA. Von allen Bedingungen wurden Triplikate analysiert. **B**, Dargestellt ist ein „volcano-plot“, in dem die Signifikanz ($-\log_{10} \text{p-Wert}$) gegen die $\log_2$ Werte von Wildtyp und *imt2-4Δ* aufgetragen ist. In grau sind die nicht signifikanten Werte abgebildet. **C**, Dargestellt ist eine „Heatmap“ mit der stärksten (gelb) und der schwächsten (schwarz) Veränderung der Genexpression im Wildtyp und in *imt2-4Δ*. **D**, Im Scatterplot werden die „Reads“ von *imt2-4Δ* gegen die vom Wildtyp aufgetragen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht eine 5-fache Veränderung der Genexpression, wobei die Gene oberhalb stärker und unterhalb der Mittellinie schwächer in *imt2-4Δ* exprimiert werden. Rot sind die Gcn4-Targetgene dargestellt. **E**, Zu D analoger Plot mit den Stämmen W9057 (*gcn4Δ*) und W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*).

Alle mRNAs, die sich auf der Diagonalen befinden, wurden bei dem RNA-Seq gleich oft im Wildtyp sowie in der *imt2-4Δ*-Mutante detektiert. Die Gene, die links oberhalb der Mittellinie dargestellt sind, werden demnach verstärkt in der *imt2-4Δ*-Mutante exprimiert. Wie schon in Abbildung 4-10 C gesehen, waren viele mRNAs, die in *imt2-4Δ* verstärkt exprimiert vorlagen, Gcn4-Targets. Mithilfe der SGD (*Saccharomyces Genome Database*) wurden die annotierten Targets von Gcn4 entnommen (siehe Anhang 10.1), mit den RNA-Sequenzierungsdaten verglichen und in den Scatterplot eingetragen (rot).

Wie schon die „Heatmap“ gezeigt hatte, waren die am stärksten exprimierten Gene in der *imt2-4Δ*-Mutante Gcn4-Targets. Es stellte sich die Frage, ob sich das Expressionsniveau der Gcn4-Zielgene nach der Deletion von *GCN4* in der eIF2-Mutante verändert. In der Tat lagen die aus der SGD annotierten Gcn4-Targets nur selten verstärkt in der *Δgcn4 imt2-4Δ*-Mutante exprimiert vor (Abbildung 4-10 E). Zusätzlich konnten weitere Gcn4 regulierte Gene, die nicht in der Datenbank vermerkt waren, gefunden werden. Zum einen waren einige mRNAs, die zuvor stark exprimiert vorlagen, in *Δgcn4 imt2-4Δ* runterreguliert. Zum anderen wurden zusätzlich Gene, die reprimiert vorlagen, wieder stärker in *Δgcn4 imt2-4Δ* abgelesen (Abbildung 4-10 D-E). Dies waren eher unerwartete Ergebnisse, da Gcn4 als ein Transkriptionsaktivator beschrieben wird, aber hier reprimierende Eigenschaften, sei es direkt oder indirekt, aufweist. Mithilfe dieser Daten ist es möglich, die Gcn4-Targets näher zu untersuchen bzw. die noch unbekannten zu bestimmen.

Im W303 Stammhintergrund wurden ebenfalls Scatterplots für die Darstellung der veränderten Genexpression angefertigt (Anhang Abbildung 10-3). Auch hier konnte eine stark veränderte Genexpression in den eIF2-Mutanten festgestellt werden, wobei die stärkste Veränderung in der *imt2-4Δ*-Mutante detektierbar war. Auch hier lagen viele *GCN4*-Targets erhöht exprimiert vor.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die isolierte mRNA (Gesamt- und polysomal assoziiert) in hoher Qualität sequenziert werden konnte. Zudem konnte eine Reihe von unterschiedlich exprimierten mRNAs detektiert werden. Die Transkriptom-Analyse lieferte ein verändertes Muster in den eIF2-Mutanten. Vor allem waren viele *GCN4*-Targets in den Mutanten deutlich erhöht. Mithilfe der *GCN4*-Deletion konnten zusätzliche nicht annotierte Targets gefunden werden. Diese wurden positiv oder negativ vom Transkriptionsfaktor beeinflusst.

4.2.3 Analyse der Translationseffizienz in eIF2-Mutanten

Die Rate der Proteinsynthese einer mRNA definiert die Translationseffizienz (Hernandez-Alias et al., 2020). Wie gut eine mRNA translatiert werden kann, hängt von unterschiedlichen Faktoren ab (Rodnina, 2016). Für eine gute Translation in der Zelle spielt neben der Konzentration der mRNAs auch die verfügbare Ressource, wie Ribosomen und tRNAs, eine wichtige Rolle. Durch die Polysomen-Profil-Analyse kann die Translationseffizienz der mRNAs bestimmt wer-

den (Pospíšek & Valášek, 2013). In 4.2.1 wurden die Polysomen-Profil-Analyse in den unterschiedlichen Stämmen durchgeführt. Zudem wurde neben der gesamten mRNA, isolierte mRNAs einer bestimmten Fraktion der Polysomen-Profile sequenziert (vgl. 4.2.2). Mithilfe dieser Daten soll neben dem veränderten Transkriptom, das Translatom der eIF2-Mutanten untersucht werden.

Für die Auswertung der Translationseffizienz (TE) wurde zunächst der Stammhintergrund S288c gewählt, von dem ein RNA-Seq der F3 erfolgte. In Abbildung 4-11 A ist ein Scatterplot der Polysomen-assoziierten mRNA dargestellt, in dem die „Reads“ der *imt2-4Δ*-Mutante gegen die „Reads“ des Wildtyps aufgetragen wurden. In der *imt2-4Δ*-Mutante konnte eine starke Veränderung der assoziierten mRNAs festgestellt werden. Allerdings geht eine veränderte Translation mit einer veränderten Transkription einher, weshalb in Abbildung 4-11 B Polysomen-assoziierte mRNAs geplottet wurden, die nur geringfügig ($\log_2 \pm 0,5$) transkriptionell verändert waren. Hier wurde deutlich, dass die meisten Polysomen-assoziierten mRNAs der dritten Fraktion in der *imt2-4Δ*-Mutante verringert vorlagen. Nur ein geringer Teil wurde besser translatiert bzw. konnte in F3 in erhöhter Menge detektiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Folge der reduzierten Translation in der eIF2-Mutante mit einer stark veränderten Transkription einhergeht.

Eine mRNA kann von mehreren Ribosomen gleichzeitig translatiert werden und je länger ein ORF ist, umso mehr Ribosomen binden und translatieren die mRNA (Arava et al., 2003). In der *imt2-4Δ*-Mutante wurde in F3 ein gewisser Teil von mRNAs mit mehr „Reads“ vorgefunden, als im Wildtyp. Es könnten in der Mutante ein Zusammenhang zwischen mRNAs mit erhöhten „Reads“ und Länge der zu translatierenden mRNAs bestehen. Mithilfe einer grafischen Darstellung wurde deshalb die Länge der codierenden Region (CDS „*coding sequence*“) in Bezug auf die „Reads“ untersucht. Für die Analyse der TE wurden ein Quotient aus den „Reads“ der polysomenalen und der Gesamt-mRNA genutzt. Dieser Quotient wurde gegen die CDS aufgetragen (Abbildung 4 11 C). Ist der Quotient größer eins, liegen die mRNAs verstärkt in der Polysomen-Fraktion vor. Für die Untersuchung wurden die Stämme aus dem S288c Stammhintergrund ohne und mit der *GCN4*-Deletion betrachtet. Bei die Analyse der dritten Fraktion (Abbildung 4-11 C oben) wurde deutlich, dass sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante die meisten mRNAs zwischen 256 und 1024 bp groß waren. Dieser Effekt war unabhängig von *GCN4*. Zusätzlich konnte visualisiert werden, dass im Wildtyp der Quotient in diesem Größenbereich und damit die Effizienz der mRNA-Translation deutlich höher war als in der *imt2-4Δ*-Mutante (im Wildtyp CDS Größe zwischen 256 und 1024 bp Maximalwert des Quotienten 30,7, Mittelwert 3,8). Die TE in der Mutante war in dem Größenbereich 256 bis 1024 bp moderat (in der *imt2-4Δ*-Mutante CDS Größe zwischen 256 und 1024 bp Maximalwert des Quotienten 11,2, Mittelwert bei 1,9).

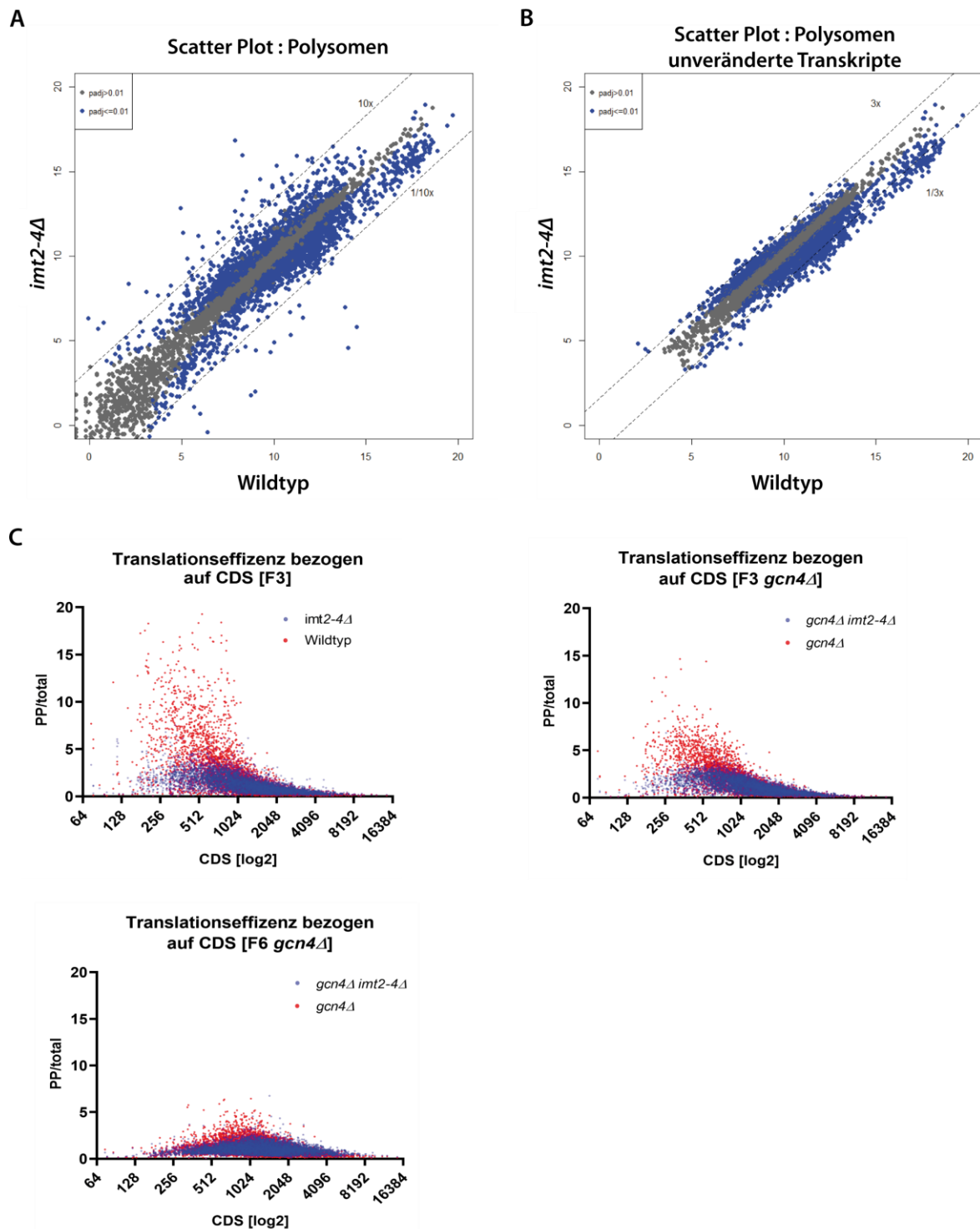


Abbildung 4-11: Translationseffizienz in Bezug auf die Länge der codierenden Region. Stämme in A-C BY4741 (Wildtyp) und W13036 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) W9057 (*gcn4Δ*) und W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*). **A**, Im Scatterplot werden die log2 „Reads“ von *imt2-4Δ* gegen Wildtyp aufgetragen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht eine 5-fache Veränderung der Genexpression, wobei die Gene oberhalb stärker und unterhalb der Mittellinie schwächer in *imt2-4Δ* exprimiert werden. **B**, Dargestellt ebenfalls ein Scatterplot, jedoch wurden hier nur die mRNAs herangezogen, die geringfügig (log2 +/- 0,5) transkriptionell verändert waren. Die gestrichelte Linie verdeutlicht eine 3-fache Veränderung der Genexpression. **C**, Es wurden die „Reads“ der polysomalen durch die Gesamt-RNA geteilt und der Quotient daraufhin gegen die Länge codierende Region (CDS) in log2, aufgetragen. Wildtyp (rot) und *imt2-4Δ* (blau) bzw. *gcn4Δ* (rot) und *imt2-4Δ gcn4Δ* (blau) wurden übereinandergelegt. F=Fraktion, PP= polysomal. Padj= Signifikanz.

Bei der genaueren Betrachtung der *gcn4*Δ-Mutanten wurde deutlich, dass die TE, vor allem der Maximalwert, abnahm (in *gcn4*Δ CDS Größe zwischen 256 und 1024 bp Maximalwert des Quotienten 14,6, Mittelwert bei 3,0, bei *imt2-4*Δ *gcn4*Δ Maximalwert 6,8 und Mittelwert 1,8, Abbildung 4-11 C oben rechts). Auch hier war die Effizienz der Translation vieler mRNAs in dem besagten Größenbereich im Wildtyp höher. Der Vergleich der beiden Daten zeigte jedoch, dass bei den *gcn4*Δ-Zellen eine geringere Dynamik vorlag. Es konnte gezeigt werden, dass die TE im Größenbereich von 256 und 1024 bp in den eIF2-Mutanten geringer war als im Wildtyp. Bei längeren mRNAs konnte kein großer Unterschied gefunden werden.

Im Stammhintergrund W303 wurden die Fraktionen F4 und F5 vereinigt und sequenziert (vgl. 4.2.2). Für die Analyse der Translationseffizienz wurde die gleiche Auswertung gewählt (Anhang Abbildung 10-4). Aufgrund der höheren Fraktion kann in dem Plot eine leichte Verschiebung der Maximalwerte in Richtung längerer CDS detektiert werden. In den eIF2-Mutanten und im Wildtyp sind die Polysomen-assoziierten mRNAs größer als 512 bp, wobei auch in den Mutanten ein höherer Anstieg der TE deutlich wird (im Wildtyp Maximalwert des Quotienten 10,3, Mittelwert 1,3, in *cdc123-326*Δ Maximalwert 6,6, Mittelwert bei 1,1, in *gcd11-Δ521* Maximalwert 5,1, Mittelwert bei 1,2, Anhang Abbildung 10-4). Die Ergebnisse entsprachen dem Erwarteten, da beide eIF2-Mutanten in den vorherigen Analysen (4.1) geringere Effekte aufzeigten als die *imt2-4*Δ-Mutante. Zudem konnte eine leichte Verschiebung in Richtung längerer CDS detektiert werden. Da in dieser Fraktion mRNAs mit 4 bzw. 5 Ribosomen selektiert wurden, war dieses Ergebnis erwartungsgemäß.

Im S288c Stammhintergrund mit zusätzlicher *GCN4*-Deletion wurde neben der dritten Fraktion auch die sechste isoliert und sequenziert. Durch die Analyse von F6 ist es möglich, mRNAs zu betrachten, die eine längere CDS haben. Bei der Untersuchung dieser Fraktion wird in beiden Genotypen eine breitere Verteilung deutlich. In dieser Fraktion wurden keine mRNAs gefunden, die eine sehr hohe TE hatten (Maximalwert in *gcn4*Δ 6,5 und Mittelwert 1,2, in *gcn4*Δ *imt2-4*Δ Maximalwert 6,8 und der Mittelwert 1,1, Abbildung 4-11 C unten). Mit dieser Fraktion konnten lange mRNAs untersucht werden. Die Translation dieser mRNAs war jedoch im Vergleich zur Transkription nicht deutlich erhöht. Auch konnte kein großer Unterschied zwischen Wildtyp und der eIF2-Mutante festgestellt werden. Da allerdings bei F3 (Abbildung 4-11 C oben rechts) schon eine geringere Dynamik vorlag, sollte das hier ebenfalls berücksichtigt werden. Dies könnte die geringere Veränderung erklären.

Die Bestimmung der TE erfolgt meistens, indem das Verhältnis von Polysomen zu Monosomen genommen wird (Pospíšek & Valášek, 2013). Bei Störungen der Translation nimmt der Anteil der Monosomen assoziierten mRNAs zu, wohingegen die Menge der gebunden Polysomen abnimmt. Dies konnte bei den eIF2-Mutanten betrachtet werden (vgl. Abbildung 4-8). In dem *gcn4*Δ-Ansatz (*gcn4*Δ, *gcn4*Δ *imt2-4*Δ) wurden zwei Fraktionen isoliert und sequenziert. Es stellte sich die Frage, ob bei einem Vergleich der beiden Fraktionen ein Unterschied zwischen den

gcn4Δ- und *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante festgestellt werden kann. Hierfür wurde ein Quotient von F6 und F3 in beiden Genotypen gebildet und in einem Scatterplot aufgetragen (Abbildung 4-12 A). Aus dem Plot wird ersichtlich, dass mRNAs, die in F6 erhöht vorlagen, deutlich vermehrt in *gcn4Δ*-Mutanten gefunden wurden, im Vergleich zur *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante. Dies spricht für eine höhere TE in *gcn4Δ*-Mutanten. Werte, die kleiner eins waren konnten in der *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante häufiger vorgefunden werden. Die Werte entsprechen mRNAs, die in F3 erhöht vorlagen. Auch diese Werte verdeutlichen eine verringerte TE in der eIF2-Mutante.

Wie schon zuvor gezeigt, waren die Fraktionen mit einem bestimmten Größenbereich der CDS gekoppelt (vgl. Abbildung 4-11 C). In welcher Fraktion eine mRNA isoliert wird, hängt somit auch von der Länge der CDS ab. Beim Vergleich der Fraktionen F6 und F3 ist es demnach von Interesse, wie die Größenverteilung der mRNAs aussieht. Hierfür wurde erneut der Quotient der beiden Fraktionen gebildet und gegen die CDS aufgetragen (Abbildung 4-12 B). Die Betrachtung des Quotienten ergab, dass mRNAs, die größer als 1024 bp sind, eine erhöhte TE haben (Quotient größer 1). Vor allem in *gcn4Δ*-Mutanten konnten vermehrt lange mRNAs mit erhöhter TE gefunden werden (rechter Rand). In der eIF2-Mutante wurde verstärkt mRNAs in F3 gefunden (Quotient kleiner 1). Auch in F6 konnten in der *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante mRNAs mit einer verstärkten TE detektiert werden. Diese waren jedoch etwas kürzer, um die 1024 bp. Mithilfe der Auswertung von zwei Fraktionen ist es möglich die TE genauer zu untersuchen. Eine geringere TE in der *gcn4Δ imt2-4Δ*-Mutante im Vergleich zur *gcn4Δ*-Mutante konnte detektiert werden.

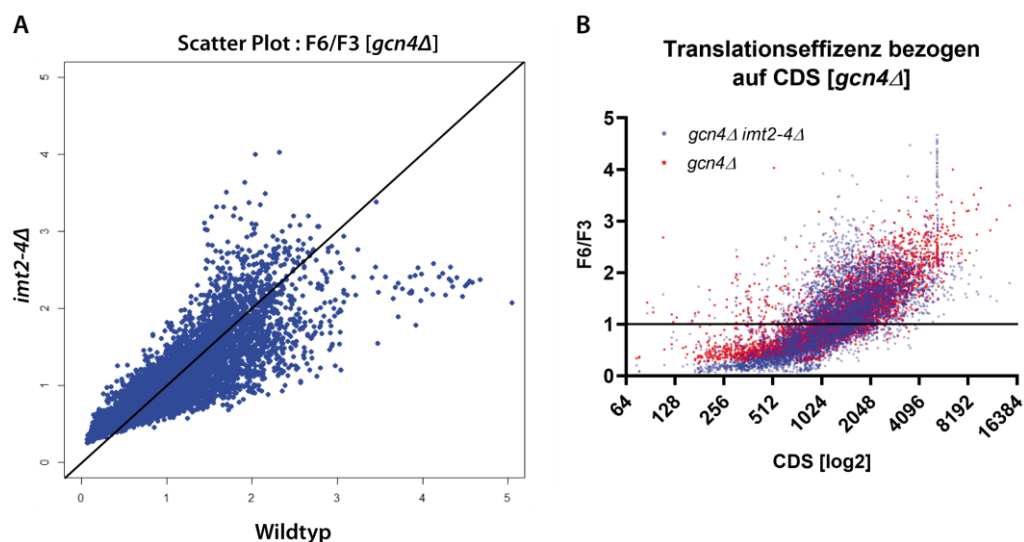


Abbildung 4-12: Vergleich der Polysomen-Fractionen F3 und F6. Aufgetragene Stämme W9057 (*gcn4Δ*) und W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*). **A**, Im Scatterplot wurde der Quotient von F6 und F3 aufgetragen. Werte, die kleiner eins sind (x- und y-Achse), entsprechen mRNAs in F3. Alles größer eins sind mRNAs, die verstärkt in F6 vorgefunden wurden. Die Daten, die oberhalb der Mittellinie sind, liegen in *gcn4Δ imt2-4Δ* stärker vor und unterhalb schwächer in *gcn4Δ imt2-4Δ*. **B**, Der Quotient aus F3 und F6 wurde errechnet und gegen die Länge codierende Region (CDS) in log2 aufgetragen. *gcn4Δ* (rot) und *imt2-4Δ gcn4Δ* (blau) F=Fraktion.

Die alleinige Untersuchung der Fraktion 3 könnte zu einem Informationsverlust über die TE von mRNAs mit langer CDS führen. Es ist denkbar, dass lange mRNAs mit hoher TE eher in

den Fraktionen 5-6 vorzufinden sind. In der dritten Fraktion entsteht der Eindruck, dass lange mRNAs in der *imt2-4Δ*-Mutante besser als im Wildtyp translatiert werden. Diese mRNAs würden jedoch im Wildtyp in einer anderen, höheren Fraktion auftreten. Für eine bessere Analyse der Translationseffizienz von mRNAs in den Mutanten sollten alle Fraktionen des Polysomen-Profiles sequenziert werden. Dadurch könnte eine Aussage über die genaue Menge der assoziierten Ribosomen auf einer mRNA getroffen werden. Wenn die Anzahl der assoziierten Ribosomen einer mRNA im Wildtyp identifiziert wurde, kann im weiteren Schritt die Veränderung der Ribosomen-Anzahl in den eIF2-Mutanten untersucht werden.

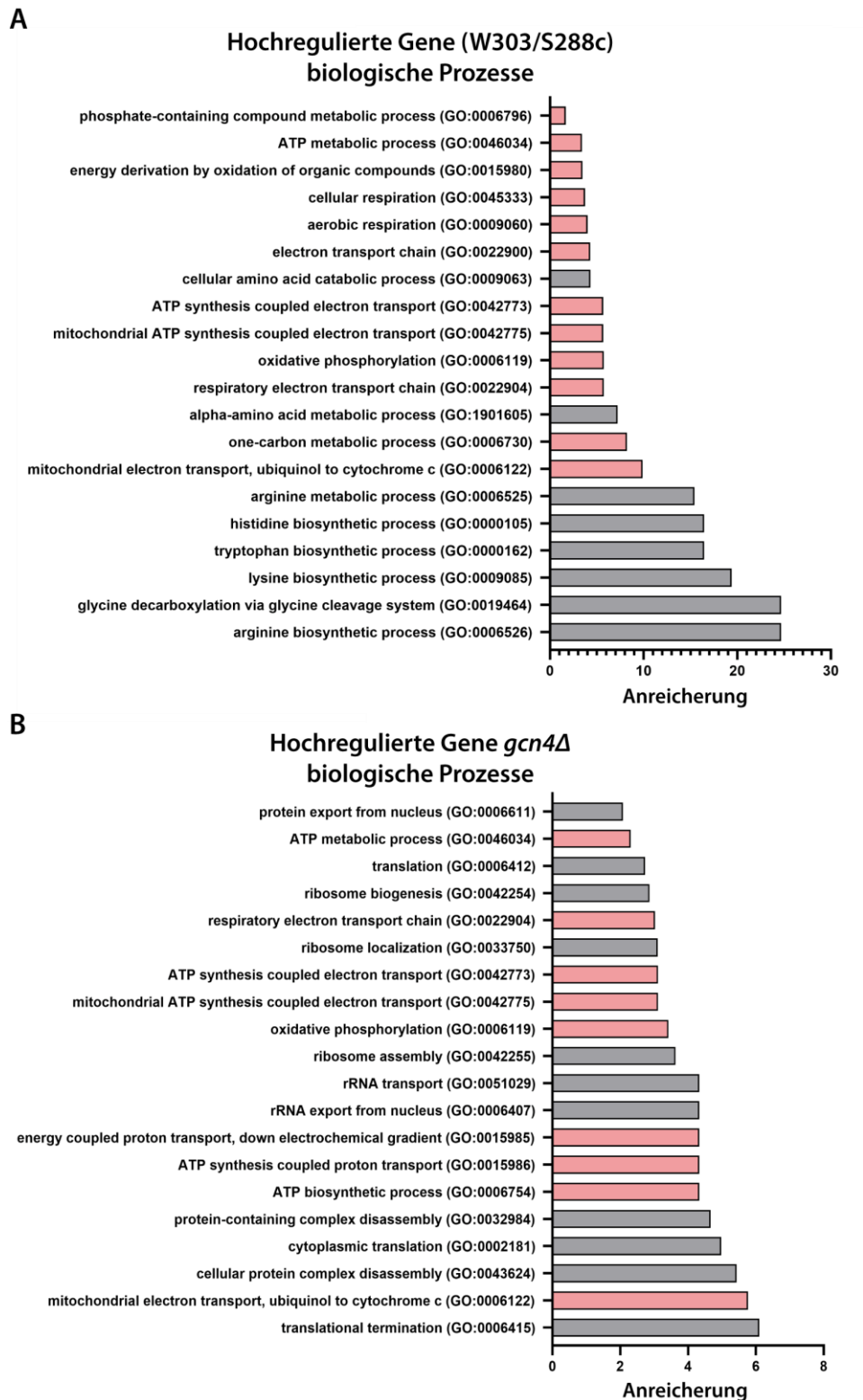
4.2.4 Gene-Ontology-Analyse

Die globalen Veränderungen des Transkriptoms können auf unterschiedliche Weise analysiert werden. Eine weitverbreitete Methode ist die Gene Ontology-(GO) Analyse (Ashburner et al., 2000). Mit diesem Verfahren ist es möglich, eine große Menge von Daten in verschiedene Gruppen, den Clustern, einzuteilen. Die eingesetzten Daten können innerhalb von drei Bereichen genauer gruppiert werden. Diese Bereiche sind zelluläre Komponente, biologischer Prozess und molekulare Funktion. Für die GO-Analyse können unterschiedliche Internetseite verwendet werden. Eine bekannte Seite für die Klassifizierung von Genen aus verschiedenen Organismen ist PANTHER („*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*“, Mi et al., 2019). Auf dieser Seite werden die eingetragenen Gene in Cluster eingeteilt. In den Ergebnissen werden neben der Anreicherung bestimmter Gruppen, auch die Signifikanz der GO-Bedingungen ausgegeben.

Die Ergebnisse der RNA-Seq ergab in den eIF2-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein stark verändertes Transkriptom. Damit untersucht werden kann, ob bestimmte Cluster in den eIF2-Mutanten verändert vorliegen, wurde die GO-Analyse angewendet. Die RNA-Seq-Daten der Gesamt-mRNA von den Experimenten des W303 und S288c Stammhintergrundes wurden zusammengefasst und als einen Ansatz betrachtet. Das Experiment mit den *gcn4Δ*-Mutanten wurde separat untersucht und stellte somit den zweiten Ansatz dar. Aus den beiden Ansätzen wurden jeweils die mRNAs herausgefiltert, die in den eIF2-Mutanten stärker ($\log_2$ größer gleich 0,5) exprimiert vorlagen. Die verstärkt exprimierten mRNAs wurden daraufhin mithilfe der PANTHER Internetseite analysiert und visualisiert (siehe Anhang 10.1).

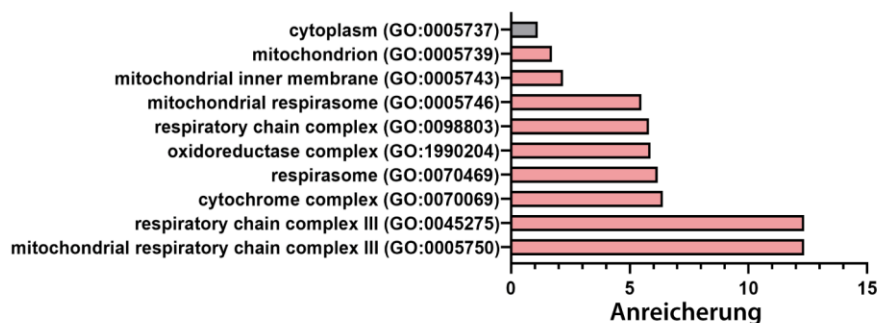
Die biologischen Prozesse umfassen Programme der Zelle, die von molekularen Aktivitäten abhängig sind. Die Analyse dieser Prozesse ergab, dass die am häufigsten vorkommenden mRNAs mit der Aminosäuren-Synthese in Verbindung stehen (Abbildung 4-13 A, grau). Dies passt zu den zuvor analysierten Daten, bei denen eine erhöhte Expression von Gcn4-Targets ermittelt wurde (vgl. Abbildung 4-10). Eine weitere identifizierte Gruppe waren mRNAs, die im Zusammenhang mit der Atmung und ATP-Generierung durch oxidative Phosphorylierung stehen (Abbildung 4-13 A, hellrot). Diese waren in den eIF2-Mutanten nicht so stark angereichert wie die Gene, die für Enzyme der Aminosäure-Synthese codieren. Jedoch war es möglich, eine signifikante Veränderung dieser GO-Terms zu identifizieren.

Bei der Betrachtung des Ansatzes, bei dem *GCN4* deletiert vorlag, waren die zuvor stark angereicherte Gruppe, Gene, die für Enzyme der Aminosäure-Synthese codieren, nicht mehr detektierbar (Abbildung 4-13 B). Auch in diesem Ansatz konnten angereicherte Gruppen identifiziert werden. Die Deletion von *GCN4* hatte demnach keinen Einfluss auf die verstärkte Expression von atmungsspezifischen Genen, denn auch diese lagen in dem Ansatz angereichert vor. (Abbildung 4-13 B, hellrot).



C

Hochregulierte Gene (W303/S288c) Zell-Lokalisation



D

Hochregulierte Gene *gcn4Δ* Zell-Lokalisation

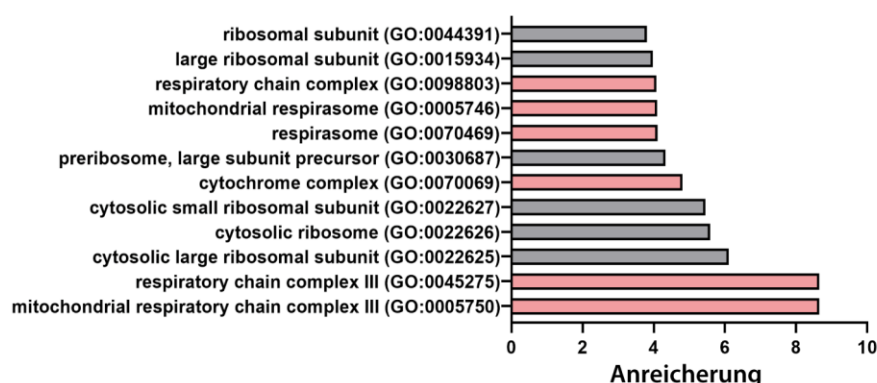


Abbildung 4-13: Gene-Ontology-Analyse. Dargestellte Stämme: **A,C**, W15596 (*cdc123-Δ326*), W15566 (*gcn11-Δ521*) W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*), **B,D**, W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*). Gene-Ontology-Analyse der hochregulierten Gene (Veränderung des log2 größer als 0,5) in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Gene wurden mit der PANTHER Internetseite analysiert und ein Teil der Gruppen visualisiert (siehe Anhang 10.1). **A,C**, W303 und S288c Mutanten zusammengefasst **A,B**, wurden die biologischen Prozesse und in **C,D**, die Zell-Lokalisation dargestellt. In hellrot sind Gruppen, die mit der oxidativen Phosphorylierung in Verbindung stehen, dargestellt. In grau sind weitere angereicherte Gruppen, die in den Mutanten verstärkt exprimiert werden, visualisiert.

Eine weitere Gruppe, die näher untersucht wurde, waren die zellulären Komponenten. Hier wird die Lokalisation der Genprodukte identifiziert, aufgelistet und zusammengefasst. Bei der Betrachtung der eIF2-Mutanten mit intaktem *GCN4*, konnte nur eine starke Anreicherung von Genen, die mit der oxidativen Phosphorylierung in Verbindung stehen, detektiert werden (Abbildung 4-13 C). Die Genprodukte sind in den Mitochondrien lokalisiert. Die Analyse dieser Gruppe bestärkt somit die Anreicherung der mRNAs aus den biologischen Prozessen.

Die Analyse der Lokalisation der Genprodukte in der *imt2-4Δ gcn4Δ*-Mutante lieferte ebenfalls eine Ansammlung von Gruppen, die mit oxidativer Phosphorylierung bzw. Mitochondrien in Verbindung stehen (Abbildung 4-13 D, hellrot). Es lagen in diesem Ansatz zudem noch GO-Terms angereichert vor, die mit der Ribosomen-Biosynthese, Assemblierung und Translation im Zusammenhang stehen (Abbildung 4-13 D, grau).

Bei der Untersuchung der mRNAs, die in den eIF2-Mutanten am stärksten reprimiert waren, konnten keine Gruppen identifiziert werden, sowohl ohne als auch mit der *GCN4*-Deletion. Die Untersuchung des dritten Bereichs, molekulare Funktion, ergab kein signifikantes Ergebnis.

Mithilfe dieser Analyse war es möglich, Gen-Gruppen in den eIF2-Mutanten zu identifizieren, die stark angereichert vorlagen. Es konnte eine Anreicherung von atmungsspezifischen Genen detektiert werden. Diese Gene liegen, unabhängig von *GCN4*, in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert vor. Im Wildtyp läuft unter optimalen Wachstumsbedingungen die Fermentation ab. Dieses Ergebnis deutet auf eine metabolische Umprogrammierung der eIF2-Mutanten hin. In den nachfolgenden Kapiteln wird diese mögliche metabolische Veränderung der eIF2-Mutanten näher untersucht. Für die weiteren Experimente wurde der Stammhintergrund W303 ausgewählt, und vor allem die *cdc123-Δ326*-Mutante, aber auch die *imt2-4Δ*-Mutante analysiert.

4.3 Veränderte Genexpression atmungsspezifischer Gene

Die Gene-Ontology-Analyse der RNA-Sequenzierungsergebnisse ergab eine erhöhte Expression von einigen Genen, die entweder in den Mitochondrien lokalisiert sind oder mit der biologischen Funktion von Mitochondrien bzw. mit der Respiration im Zusammenhang stehen. In einer Studie wurde das Mitochondrien-Proteom untersucht (Morgenstern et al., 2017). Hier wurde die Expression der Gene, die für Enzyme der oxidativen Phosphorylierung sowie Gene, die für andere mitochondriale Proteine codieren, näher analysiert. Die Studie erfolgte zudem in unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, wodurch es möglich war, einen Zusammenhang zwischen Genexpression und Kohlenstoffquelle zu erhalten. Es ergab sich die Frage, ob die in den eIF2-Mutanten hochregulierten mRNAs auch in Zellen, die mit einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen, verstärkt exprimiert werden. Hierfür wurden die zuvor erhobenen RNA-Seq-Daten mit dieser Publikation verglichen und in 2 Gruppen unterteilt. Proteine, die für die Atmungskette verantwortlich sind (Abbildung 4-14 links) und Proteine, die in den Mitochondrien lokalisiert sind und nicht atmungsspezifische Aufgaben übernehmen (Abbildung 4-14 rechts). Die einzelnen Gene, die für die aufgeführten Proteine codieren, können aus der beschriebenen Studie entnommen werden (siehe Anhang 10.1; Morgenstern et al., 2017). Gene der ersten Gruppe werden verstärkt exprimiert, wenn den Zellen keine Glukose zur Verfügung steht (Morgenstern et al., 2017). Die Expression der Gene, die für die atmungsspezifischen Enzyme codieren, sind zum größten Teil in der *cdc123-Δ326*-Mutante und noch stärker in der *imt2-4Δ*-Mutante erhöht (stärkste log₂ Veränderung im TCA betrug in *cdc123-Δ326* 1,9 und in *imt2-4Δ* stärkste Veränderung im Cytochromkomplex 4 (Cyt IV) 2,2, Abbildung 4-14 links oben und unten). Ein wichtiger Regulator vieler Gene der oxidativen Phosphorylierung ist der Transkriptionsfaktor Hap4. In den eIF2-Mutanten konnte eine verstärkte *HAP4*-Expression detektiert werden (log₂ 1,28 in *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp).

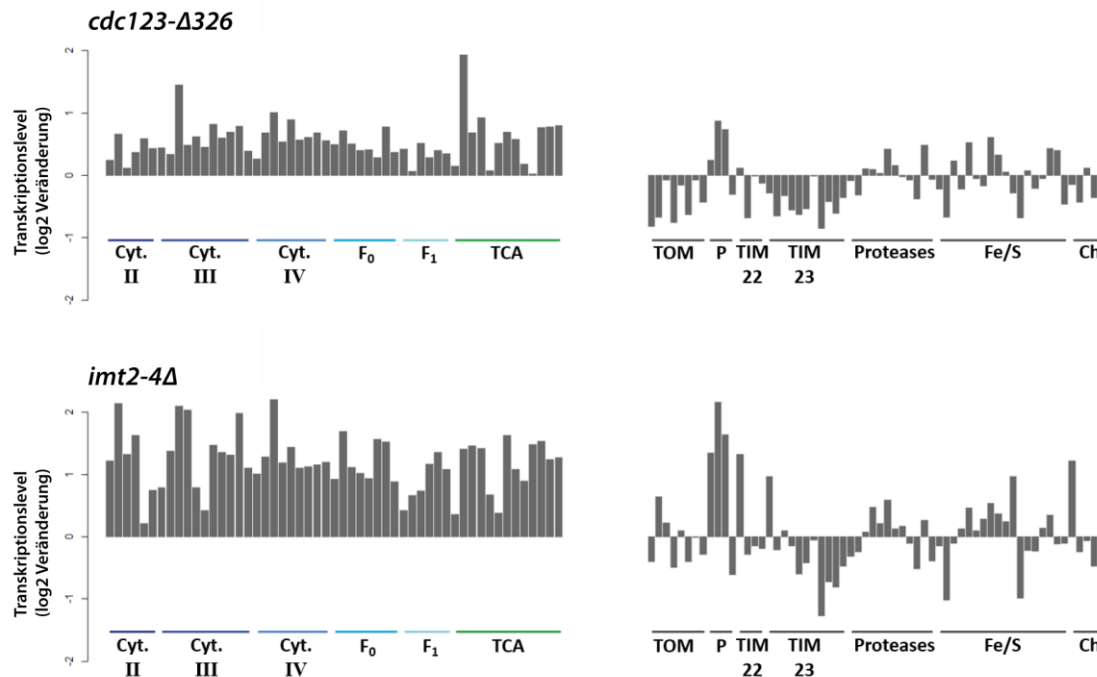


Abbildung 4-14: Veränderte Expression der Gene, die für mitochondriale Proteine codieren. Log2 Veränderungen der mRNA „Reads“ von Wildtyp (K699) und den eIF2-Mutanten W15596 (*cdc123-Δ326* oben) und W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ* unten). Auf der linken Seite sind oben und unten die Gen-Gruppen aufgeführt, die für die oxidative Phosphorylierung nötig sind (Cyt= Cytochromkomplex 2-4, F₀F₁= ATP-Synthasen, TCA (Tricarbonsäure-Zyklus). Auf der rechten Seite sind Gruppen von Genen, deren Produkte in den Mitochondrien lokalisiert sind. Diese sind zum einen für den Import von Proteinen (TOM „translocase of the outer membrane“, TIM22, TIM23 „translocase of the inner membrane“) verantwortlich. Des Weiteren sind Transmembranproteine (Porin (P)), Proteine, die für Ab- und Zusammenbau (Proteasen, Chaperone (Ch)) nötig sind und Proteine, die für die Eisen/Schwefelcluster Biogenese und Eisen-Homöostase verantwortlich sind (Fe/S), in dieser Gruppe aufgeführt. Die einzelnen Gene, die für die aufgeführten Proteine codieren können aus Morgenstern et al., 2017 entnommen werden und sind im Anhang 10.1 zu finden.

Die Untersuchung der Gene, die für mitochondrial lokalisierte Proteine codieren, aber nicht an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, ergab keine Richtungstendenz in den eIF2-Mutanten. Bei diesen Genen wurden manche schlechter und manche besser in den eIF2-Mutanten exprimiert (Abbildung 4-14 rechts oben und unten). Auffällig war, dass drei Gene, die für Porine codieren, in beiden Mutanten stärker abgelesen wurden. Zum Beispiel konnte eine stärkere Expression der Gene, *OM14* und *OM45* in beiden Mutanten beobachtet werden. Beide Gene sind Kohlenstoff abhängig und liegen im Wildtyp in erhöhter Menge vor, wenn den Zellen Glycerin statt Glukose zur Verfügung steht (Morgenstern et al. 2017, SGD). Auf die meisten anderen Gene dieser Gruppe hat Glukose kaum einen Einfluss (Morgenstern et al. 2017, SGD).

Diese Analyse bestätigt die vorherigen Daten, da nur die Gene, die im Zusammenhang mit der Kohlenstoffquelle oder der oxidativen Phosphorylierung stehen, erhöht in den eIF2-Mutanten exprimiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Inhibierung der Translation zu einer erhöhten Expression atmungsspezifischer Gene führt. Zuvor wurde gezeigt, dass diese atmungsspezifischen Gene dann verstärkt exprimiert werden, wenn den Zellen keine Glukose zur Verfügung steht (Morgenstern et al. 2017, SGD).

4.3.1 Veränderte Mitochondrienmorphologie in eIF2-Mutanten

Zellen, denen eine nicht fermentierbare Kohlstoffquelle zur Verfügung steht, nutzen zur Energiegewinnung die oxidative Phosphorylierung (Busti et al., 2010). Neben einer erhöhten Expression von atmungsspezifischen Genen, haben diese Zellen auch eine veränderte Mitochondrienstruktur (Egner et al., 2002). Die Morphologie von Zellen, die in Glukose gewachsen sind, ist relativ einfach: kein verflochtenes Netzwerk, sondern eine einzelne schlauchförmige Struktur. Die Mitochondrienmorphologie von Zellen, die in Glycerin gewachsen sind, ist im Unterschied dazu verzweigter und filigraner. Da, wie schon gezeigt, die eIF2-Mutanten verstärkt atmungsspezifische Gene exprimieren, stellte sich die Frage, ob Unterschiede in der Mitochondrienstruktur im Vergleich zum Wildtyp vorliegen. Um die Struktur der Mitochondrien zu untersuchen, wurde eine mitochondriale GFP fusionierte Präsequenz herangezogen (Westermann & Neupert, 2000). Diese GFP markierte Präsequenz lag in einem ARS/CEN-Plasmid (Autonom replizierende Sequenz/Centromer-Region) vor. Ausgehend von diesem Konstrukt wurde die Sequenz in ein integratives Plasmid kloniert und in die Hefen eingebracht. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Zellen ein gleich starkes GFP-Signal hatten. Zudem war kein Selektivmedium für die Anzucht notwendig. Die mitochondriale Struktur wurde in Medium mit Glukose oder mit Glycerin analysiert.

Der visuelle Vergleich zwischen den Genotypen weist auf eine vernetzte Struktur in der Mutante hin (Abbildung 4-15 A). Im Wildtyp, gewachsen in XYD, ist eine einfache einzelne Struktur zu erkennen. Die in Glycerin gewachsenen Stämme, Wildtyp und *cdc123-Δ326*, hatten hingegen eine stark verzweigte Struktur. Mithilfe von Image J und dem „Yeast MitoMap“ Plug-In konnte das Volumen und die Oberfläche der Mitochondrien ermittelt werden (Vowinckel et al., 2015). Durch die Messung war es möglich, neben dem visuellen Eindruck ein robustes Ergebnis zu generieren. Die Messung ergab, dass in der *cdc123-Δ326*-Mutante die Mitochondrien ein vergrößertes Volumen sowie eine vergrößerte Oberfläche im Vergleich zum Wildtyp hatten (n=50 Volumen im Wildtyp in XYD Mittelwert $8 \mu\text{m}^3$ und in *cdc123-Δ326* $12,4 \mu\text{m}^3$, Oberfläche im Wildtyp in XYD Mittelwert $76 \mu\text{m}^2$ und in *cdc123-Δ326* $111 \mu\text{m}^2$, Abbildung 4-15 C). Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wird in Zellen, die mit Glycerin gewachsen sind, eine stark verzweigte Struktur noch deutlicher. Im Wildtyp und der eIF2-Mutante, die mit der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle angezogen wurden, ist kaum ein Unterschied zu erkennen (n=50 Volumen Wildtyp in XYGly Mittelwert $17,6 \mu\text{m}^3$ und in *cdc123-Δ326* $20 \mu\text{m}^3$, Oberfläche im Wildtyp in XYGly Mittelwert $171,6 \mu\text{m}^2$ und in *cdc123-Δ326* $182,8 \mu\text{m}^2$, kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen in XYGly nicht eingezeichnet, Abbildung 4-15 C).

Es entsteht der Eindruck, dass die eIF2-Mutanten verstärkt respirieren. Da das Volumen der Mitochondrien in der eIF2-Mutante etwas geringer ist als in atmenden Zellen, liegt die Vermutung nahe, dass sie nicht ausschließlich Atmung betreiben.

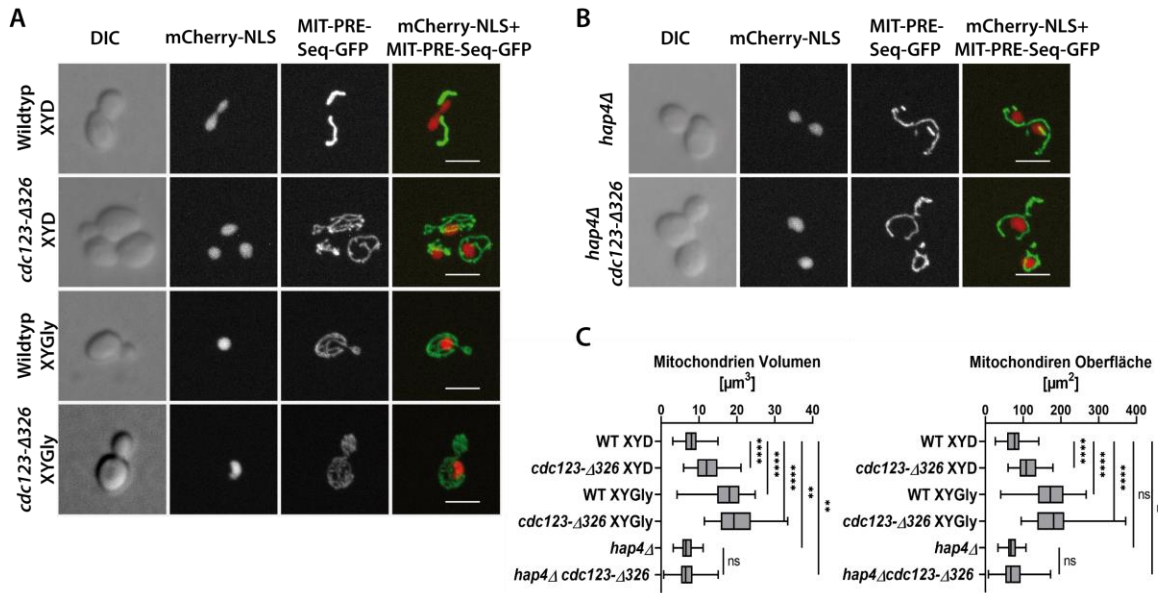


Abbildung 4-15: Mitochondrienmorphologie in *cdc123-Δ326*. **A**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W16807 (*mCherry-NLS pTEF2-PRE-Seq.-GFP*) W16808 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS pTEF2-PRE-Seq.-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD und XYGly angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SGly++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm , zwischen den Ebenen, verwendet **B**, Die Stämme W18082 (*hap4Δ mCherry-NLS pTEF2-PRE-Seq.-GFP*) und W18083 (*cdc123-Δ326 hap4Δ mCherry-NLS pTEF2-PRE-Seq.-GFP*) wurden genauso wie in A behandelt, das Wachstum erfolgte nur in XYD und Mikroskopie nur unter SD++ Agar. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . DIC: Differential-Interferenz-Kontrast MIT-PRE-Seq: mitochondriale Präsequenz fusioniert mit GFP. **C**, Darstellung der Mitochondrien-Volumina und -Oberflächen von 50 Zellen aus A und B. Es wurde jeweils das Volumen links und die Oberfläche rechts mithilfe des Image J Plug-Ins „Yeast MitoMap“ gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte, bei Normalverteilung nach Shapiro Wilk Test, durch einen ungepaarten t-Test. Wenn keine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Signifikanz: ns= nicht signifikant, ** $p < 0,0003$, **** $p < 0,0001$.

In den eIF2-Mutanten war die Expression atmungsspezifischer Gene hochreguliert (vgl. Abbildung 4-14). Zudem konnte eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Hap4 in den eIF2-Mutanten gefunden werden (vgl. 4.3). Hap4 ist ein wichtiger Regulator vieler Gene der oxidativen Phosphorylierung (Bolotin-Fukuhara, 2017; Gancedo, 1998). Da in der *cdc123-Δ326*-Mutante eine vernetzte Mitochondrienstruktur detektiert werden konnte und zusätzlich *HAP4* erhöht exprimiert vorlag, stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor die Struktur beeinflusst. Um diese Frage zu beantworten, wurde *HAP4* deletiert und mit dem gleichen mitochondrialen Marker kombiniert. Sowohl die Mikroskopiedaten als auch die Messung der Volumina und Oberfläche ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen der *cdc123-Δ326 hap4Δ*- und der *hap4Δ*-Mutante (Abbildung 4-15 B-C). Das Volumen war in beiden Mutanten geringer als im Wildtyp, der mit Glukose wuchs ($n=50$ Volumen in *hap4Δ* im Mittel 6,7 μm^3 und bei *cdc123-Δ326 hap4Δ* 6,9 μm^3 , Oberfläche von *hap4Δ* Mittel 71 μm^2 und bei *cdc123-Δ326 hap4Δ* 76,7 μm^2 , Abbildung 4-15 C). Daten mit der *hap4Δ*-Mutante in XYGly konnten nicht erhoben werden, da die Mutante atmungsdefizient war und nicht mit dieser Kohlenstoffquelle wuchs (Anhang Abbildung 10-5 B). Nach der Überexpression des Transkriptionsfaktors (*pTEF2-HAP4*) konnte in XYD eine ähnlich verzweigte Mitochondrienstruktur wie in den *cdc123-Δ326*-

Mutanten detektiert werden (Anhang Abbildung 10-5 A). Dies lässt den Schluss zu, dass die mitochondriale Struktur durch Hap4, direkt oder indirekt, beeinflusst wird.

4.3.2 Transkriptionsfaktor Hap4

Eine hohe Anzahl von atmungsspezifischen Genen wird durch den HAP-Komplex reguliert (Bolotin-Fukuhara, 2017; Gancedo, 1998). Der Hap-Komplex besteht aus vier Untereinheiten. Drei davon besitzen eine DNA-Bindedomäne (Hap2,3,5) und eine Untereinheit (Hap4) eine Aktivierungsdomäne. Nachdem Glukose im Medium verbraucht ist oder eine andere nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle der Hefe zur Verfügung steht, werden die atmungsspezifischen Gene verstärkt exprimiert. Auch die Expression von *HAP4* wird durch Glukose reguliert. Die drei Untereinheiten Hap2,3,5 bilden ein Trimer und binden daraufhin an Bereiche der DNA mit dem Bindemotiv CCAAT, welches verstärkt in atmungsspezifischen Genen vorkommt. Diese Untereinheiten werden nicht durch Kohlenstoffquellen reguliert. Nach der Expression von *HAP4* und der Bindung des Transkriptionsaktivators an das Trimer, werden die Gene der Atmungskette abgelesen (Bolotin-Fukuhara, 2017; Abbildung 4-16 A). Die veränderte mitochondriale Struktur sowie die RNA-Sequenzierungsergebnisse veranlassten weitere Untersuchungen von Hap4. Die RNA-Sequenzierung lieferte eine mehr als doppelte so hohe *HAP4* Transkriptmenge in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Menge der „Reads“ in Wildtyp 1309 und in *cdc123-Δ326* 3282). Für weitere Analysen wurde die Hap4-Lokalisation, sowie die Proteinmenge im Western-Blot betrachtet.

Der Wildtyp und die eIF2-Mutanten wurden in Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen analysiert (Abbildung 4-16 B-C). Das Hap4-GFP konnte in beiden Genotypen unter Glukose-Bedingungen nur sehr schwach im Nukleus detektiert werden. In Glycerin war Hap4-GFP vor allem im Kern des Wildtyps sichtbar. In der *cdc123-Δ326*-Mutante konnte ebenfalls ein Signal im Nukleus detektiert werden, dieses war jedoch schwächer (Abbildung 4-16 B). Es war somit nicht möglich, in den eIF2-Mutanten eine erhöhte Hap4-Menge im Nukleus zu finden.

In Gegenwart von Glukose wurde mithilfe der Western-Analyse in der eIF2-Mutante etwas weniger Hap4 detektiert. Die Proteinbanden sahen allerdings in der *cdc123-Δ326*-Mutante diffuser aus. Eine Modifikation von Hap4 in XYD kann somit in der Mutante nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 4-16 C links). Wie schon in der Mikroskopie erkennbar, war auch die Proteinmenge im Western-Blot in der *cdc123-Δ326*-Mutante in XYGly geringer als im Wildtyp (Abbildung 4-16 C rechts). In der Mutante konnte zudem eine deutliche Abnahme der Hap4-Menge in Zellen, die in Gegenwart von Glycerin statt Glukose gewachsen sind, detektiert werden.

HAP4 besitzt einen langen 5'-Leader (251 Basen) mit 2 uORFs (Bolotin-Fukuhara, 2017; Heyer & Moore, 2016; Ingolia et al., 2009; Nagalakshmi et al., 2008; Abbildung 4-16 D). Wie bei *GCN4* (vgl. 4.1.1), könnte die Translation der *HAP4*-mRNA durch die lange 5'-Region und durch die 2 uORFs reguliert sein. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde ein Reporter-Kon-

strukt mit dem 5'-*Leader* von *HAP4* generiert. Das Gen für ein MYC13-Epitop markiertes Protein wurde für die Analyse mit der 5'-Region fusioniert. Der *HAP4*-Promotor steuert die Expression des Fusionsproteins und kann mithilfe der Western-Analyse untersucht werden. Neben der wildtypischen 5'-Region wurden außerdem die zwei uORFs sowohl einzeln als auch zusammen mutagenisiert und analysiert. Aus dem jeweiligen Startcodon wurde ein Stopcodon (TAG) generiert, wodurch kein Start der Translation an der Stelle möglich war. Um sicherzustellen, dass die Genkopien der integrierten Konstrukte identisch waren, wurde zunächst die Integrationshäufigkeit der Konstrukte mithilfe der qPCR getestet. Nachdem die Gendosis der Konstrukte angepasst wurde, konnten die hergestellten Stämme mit der *cdc123-Δ326*-Mutante gekreuzt und in der Western-Analyse untersucht werden. Die Stämme wurden sowohl in XYD als auch im XYGly Medium angezogen und mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 4-16 E).

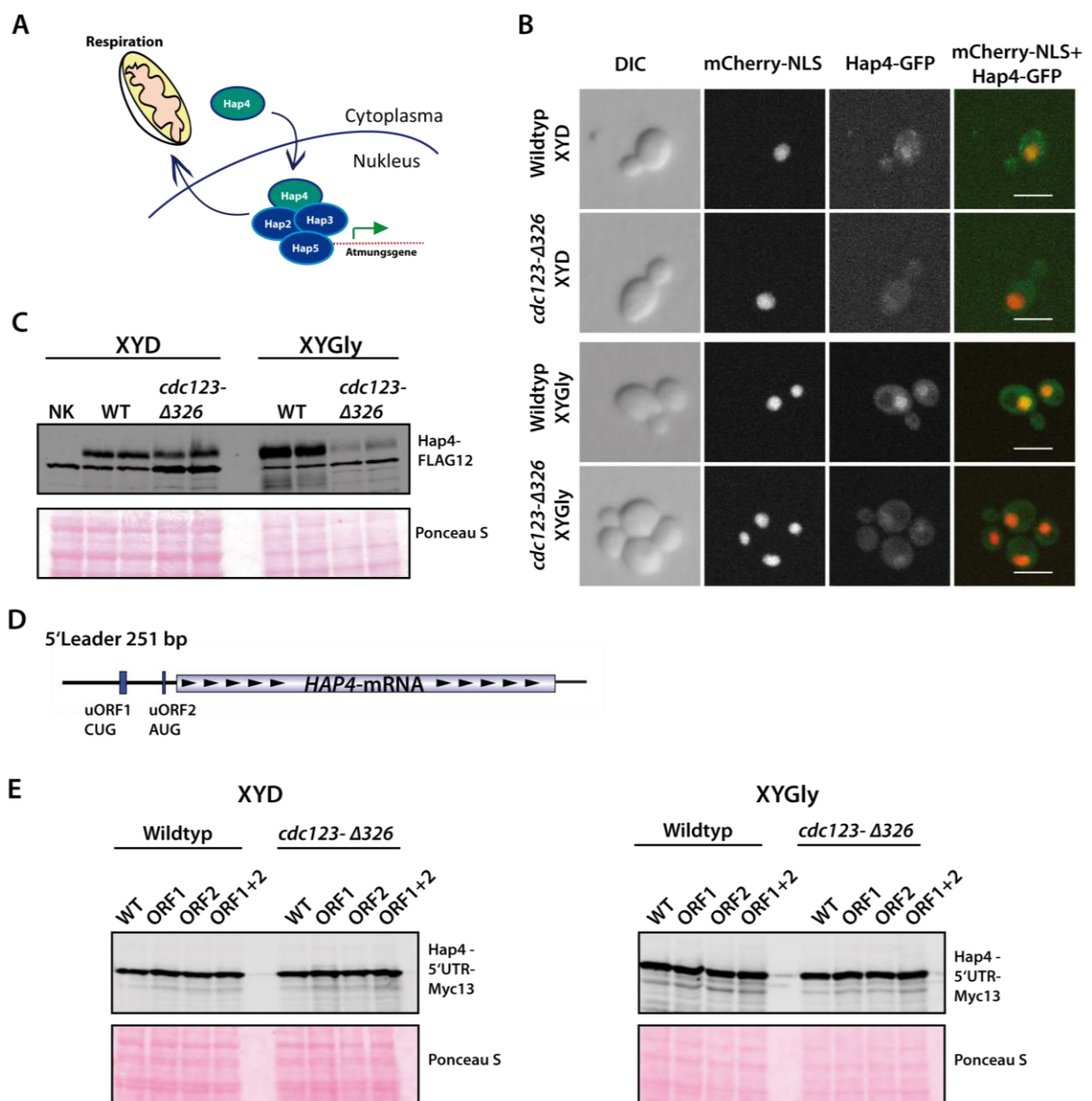


Abbildung 4-16: Analyse von Hap4 in *cdc123-Δ326*. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

A, Schematische Darstellung vom Hap-Komplex. *HAP4*-Expression wird durch Kohlenstoffquelle gesteuert. Bei Vorhandensein einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wird es an das Trimer (Hap2,3,5) rekrutiert. Das Trimer bindet an das DNA-Bindemotiv CCAAT von Genen der Atmungskette. Durch die von Hap4 ausgelöste Aktivierung können diese Gene exprimiert werden. **B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17888 (*HAP4-GFP mCherry-NLS*), W17890 (*cdc123-Δ326 HAP4-GFP mCherry-NLS*) über Nacht bei 25°C in XYD und XYGly angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SGly++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **C**, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD und XYGly bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: W17884 (*HAP4-FLAG12*) und W177886 (*cdc123-Δ326 HAP4-FLAG12*) Für die Western-Analyse wurden 2 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Hap4 mit einem FLAG-spezifischen Antikörper, α-FLAG M2, als Ladekontrolle wurde die PonceauS-Färbung, die das gesamte Proteom darstellt, herangezogen. **D**, Schematische Darstellung von der *HAP4* mRNA mit den 2 uORFs im 5'-*Leader*. **E**, Die Stämme W17397 (*HAP4-5'UTR-MYC13*) W17399 (*cdc123-Δ326 HAP4-5'UTR-MYC13*), W17402 (*HAP4-5'UTR (ORF1 CUG→TAG)-MYC13*) W17404 (*cdc123-Δ326 HAP4-5'UTR (ORF1 CUG→TAG)-MYC13*) W17407 (*HAP4-5'UTR (ORF2 AUG→TAG)-MYC13*) W17409 (*cdc123-Δ326 HAP4-5'UTR (ORF2 AUG→TAG)-MYC13*) W17412 (*HAP4-5'UTR ((ORF1 CUG→TAG) (ORF2 AUG→TAG)) -MYC13*) W17414 (*cdc123-Δ326 HAP4-5'UTR ((ORF1 CUG→TAG) (ORF2 AUG→TAG)) -MYC13*) wurden wie in C vorbereitet. Der Nachweis erfolgte für Hap4-5'UTR mit einem Myc-spezifischen Antikörper, α-Myc 9E10, als Ladekontrolle wurde die PonceauS-Färbung, die das gesamte Proteom darstellt, herangezogen.

In XYD und in XYGly konnte sowohl im Wildtyp als auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante kein Unterschied in der Proteinmenge zwischen dem wildtypischen und dem mutagenisierten 5'-*Leader* detektiert werden. Auch die Menge zwischen den zwei Genotypen variierte nicht (Abbildung 4-16 E). Dieses Ergebnis lieferte somit keinen Hinweis auf eine regulierte Translation der *HAP4*-mRNA.

Für weitere Analysen des Transkriptionsfaktors in den eIF2-Mutanten wurde *HAP4* deletiert sowie überexprimiert. Die Deletion bewirkte in den Zellzyklus- und Wachstumsanalysen auf XYD keinen erkennbaren Effekt (Anteil 1C-Zellen im Wildtyp auf XYD 12%, in *hap4Δ* 12%, in *cdc123-Δ326* 37% und in *cdc123-Δ326 hap4Δ* 36%, Anhang Abbildung 10-5 B-C). Auf XYGly konnte kein Wachstum der Stämme mit *hap4Δ* detektiert werden. Die Überexpression hatte zur Folge, dass Wildtyp und *cdc123-Δ326* auf XYGly besser gewachsen sind (Anhang Abbildung 10-5 A). In XYD konnte kein Wachstumsunterschied festgestellt werden, allerdings war ein verspäteter Zellzykluseintritt sichtbar (Anteil 1C-Zellen auf XYD in *pTEF2-HAP4* 23%, und in *cdc123-Δ326 pTEF2-HAP4* 50%, Anhang Abbildung 10-5 B, C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine erhöhte Expression von *HAP4* zu einem verlangsamten Zellzykluseintritt führt. Eine Deletion des Transkriptionsfaktors half der eIF2-Mutante jedoch nicht schneller in den Zellzyklus einzutreten.

Insgesamt lieferten die Ergebnisse eine erhöhte Expression der atmungsspezifischen Gene sowie eine veränderte Mitochondrienstruktur in der *cdc123-Δ326*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Der Haupttranskriptionsfaktor, der für die Expression dieser Gene verantwortlich ist, zeigte keine erhöhte Proteinmenge und keine durch den 5'-*Leader* regulierte Translation. Die Wiederherstellung der wildtypischen mitochondrialen

Struktur in der *cdc123-Δ326 hap4Δ*-Mutante war allerdings eine interessante Beobachtung, da anscheinend Hap4 die Struktur in der eIF2-Mutante direkt oder indirekt beeinflusst (Abbildung 4-15 C).

4.4 Glukose gesteuerte Prozesse

Für *S. cerevisiae* ist Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die Energiegewinnung (Kim et al., 2013; Santangelo, 2006). Neben der Aufnahme und Verstoffwechselung des Zuckers spielen regulatorische Mechanismen, die durch Glukose induziert werden, eine entscheidende Rolle. In der Zelle gibt es ein Wechselspiel zwischen zwei Glukosesignalwegen. Der Induktionsweg ist für die Aufnahme von Glukose und die Expression von relevanten Genen zuständig. Glukose ist zudem verantwortlich für die Repression der Gene, welche für Enzyme codieren, die an der Atmung oder am Stoffwechsel alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind. Die Hefezelle erkennt durch unterschiedliche Sensoren, ob Glukose im Medium vorhanden ist (Celenza et al., 1988; Özcan et al., 1996; Özcan & Johnston, 1999). Über die Hexose-Transporter wird Glukose aufgenommen und durch verschiedene Enzyme der Glykolyse verstoffwechselt. Sobald Glukose im Medium aufgebraucht ist, kommt es zu einer Umprogrammierung der Zellen. Es werden nun Gene exprimiert, die sonst durch Glukose reprimiert vorliegen. Dazu gehören solche Gene, die für die Gluconeogenese-Enzyme codieren und solche, die für Enzyme codieren, um andere Kohlenstoffquellen nutzen zu können (Sanz, 2003). Der Übergang zwischen exponentiellem Wachstum mit Glukose und stationärer Phase, nachdem die Zellen Glukose aufgebraucht haben, nennt sich diauxischer Wechsel (Carlson, 1999; Schüller, 2003; Soontornngun, 2017).

Die RNA-Seq-Daten ergaben, dass atmungsspezifische Gene in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert werden (vgl. 4.2.4, 4.3). Daraus kam die Frage hervor, ob die Glukose-reprimierte Gene in den Mutanten verstärkt abgelesen werden. In einer genomweiten Analyse wurden Transkriptionsprofile unterschiedlicher Wachstumsphasen einer Hefekultur untersucht (Radonjic et al., 2005). Hierfür wurde die Kultur neun Tage wachsen gelassen und Microarray-Expressionsprofile von verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. In dieser Studie war es möglich, die veränderten Transkripte nach dem diauxischen Wechsel und in der stationären Phase zu identifizieren. Diese Gene lagen zuvor unter exponentiellen Wachstumsbedingungen mit Glukose reprimiert vor. Die publizierten dereprimierten Gene wurden mit den erhobenen RNA-Seq-Daten verglichen (siehe Anhang 10.1) und in einem Scatterplot aufgetragen (Abbildung 4-17). Aus den Plots ist deutlich zu erkennen, dass Gene, die im exponentiellen Wachstum im Wildtyp durch Glukose reprimiert vorliegen, in den eIF2-Mutanten nun stärker exprimiert werden. Dieser Effekt wurde in der *imt2-4Δ*-Mutante noch deutlicher als in der *cdc123-Δ326*-Mutante (in Rot sind die beschriebenen Gene dargestellt, Abbildung 4-17).

Unter den Glukose-reprimierten Genen, die in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert vorliegen, gehörte auch *XBP1*, welches für einen globalen Transkriptionsrepressor codiert (log₂ Veränderung zum Wildtyp, *cdc123-Δ326* 1,1 und in *imt2-4Δ* 2,1). Wie schon zuvor beschrieben (vgl. 4.1.4) konnte eine erhöhte Expression in Zellen die Glukose aufgebraucht haben gefunden werden (Miles et al., 2013). Zusätzlich konnte mithilfe der qPCR eine erhöhte mRNA-Menge von *XBP1* im Wildtyp der mit Glycerin gewachsen ist detektiert werden (vgl. 4.1.4). Das Cytochrom b2 wird ebenfalls durch Glukose reprimiert und liegt in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert vor (log₂ Veränderung zum Wildtyp in *cdc123-Δ326* 1,5 und in *imt2-4Δ* 3,0).

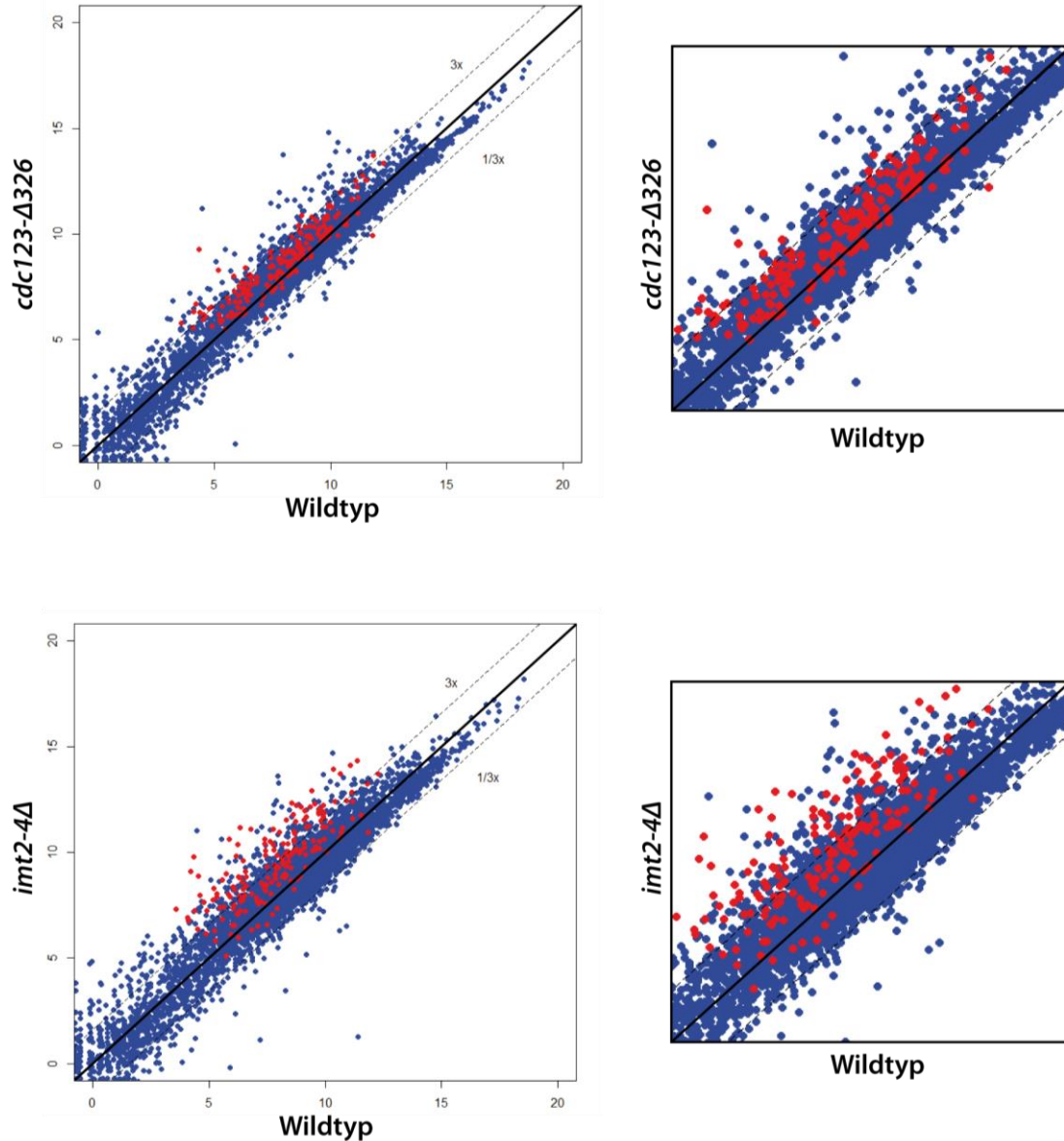


Abbildung 4-17: Erhöhte Expression von Glukose-reprimierten Gene in eIF2-Mutanten. Die Daten aus der RNA-Sequenzierung von den Stämmen K699 (Wildtyp) W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*) W15596 (*cdc123-Δ326*) wurden mit den Daten von Radonjic et al., 2005 abgeglichen. Aufgetragen sind die log₂ Werte der „Reads“ vom Wildtyp, x-Achse, und eIF2-Mutante, y-Achse, der einzelnen detektierten mRNAs aus dem Sequenzierungsexperiment (rot und blau). Die 180 am stärksten exprimierten Gene während des diauxischen Wechsels aus der Publikation (Radonjic et al., 2005), wurden in dem Scatterplot rot markiert (siehe Anhang 10.1). Links sind die kompletten Daten aufgetragen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht eine 3x Verstärkung bzw. Verminderung (1/3) der Genexpression in den Mutanten. Rechts ist jeweils der relevante Ausschnitt vergrößert dargestellt.

Nachdem Glukose aufgebraucht ist und Ethanol als Energiequelle herangezogen wird, erfolgt eine erhöhte Expression der Aldehyd-Dehydrogenase (*ALD*) (Aranda & del Olmo, 2003). Die *ALD4* liegt unter Glukose Wachstumsbedingungen reprimiert vor und wird während des diauxischen Wechsels verstärkt exprimiert. Auch in den eIF2-Mutanten konnte eine erhöhte Expression gefunden werden (log2 Veränderung zum Wildtyp, *cdc123-Δ326* 0,9 und in *imt2-4Δ* 2,9).

Die erhöhte Expression der Glukose-reprimierten Gene in den eIF2-Mutanten deutet erneut auf einen veränderten Stoffwechselweg hin. Der Snf1-Mig1-Signalweg trägt zum Wechselspiel zwischen Expression und Repression bei (Kim et al., 2013).

4.4.1 Glukose-Repression durch den Transkriptionsfaktor Mig1

Viele Gene, die während des exponentiellen Wachstums in Anwesenheit von Glukose reprimiert sind, werden durch Mig1 reguliert (Alipourfard et al., 2019). Mig1 ist ein bekannter Transkriptionsfaktor, der beim Wachstum mit Glukose im Kern lokalisiert ist. Nach dem Verbrauch der Glukose wird Mig1 durch Msn5 aus dem Kern exportiert (Abbildung 4-18 A). Da die Glukose-reprimierten Gene in den eIF2-Mutanten hochreguliert sind, stellte sich die Frage, ob Mig1 in den Mutanten verändert vorliegt. Zur näheren Untersuchung des Proteins erfolgte eine Herstellung von Stämmen, bei denen Mig1 mit GFP und FLAG fusioniert wurde. In der Mikroskopie war deutlich zu erkennen, dass in der *cdc123-Δ326*-Mutante weniger Mig1-GFP im Kern lokalisiert war. Diese optische Einschätzung (Abbildung 4-18 B) wurde zusätzlich durch eine Quantifizierung bestätigt. Hierfür wurde für jede Zelle die integrierte Dichte des Signals des Zellkernmarkes (*mCherry*-NLS) sowie die des im Kern lokalisierten Mig1-GFP-Signals mittels Image J erfasst und ein Quotient gebildet. Die normalisierten Werte (auf das jeweilige *mCherry*-Kernsignal) für Wildtyp und *cdc123-Δ326* sind in Abbildung 4-18 C dargestellt. In der eIF2-Mutante war, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich weniger Mig1 im Kern lokalisiert (n=50 Zellen im Wildtyp Mittelwert 1,2 und in *cdc123-Δ326* 0,7, entspricht 55% vom Wildtyp-Signal, Abbildung 4-18 C).

Die verminderte Mig1-Menge der *cdc123-Δ326*-Mutante im Kern brachte die Frage hervor, ob in der Mutante eine Störung im Pendeln zwischen Kern und Cytoplasma vorliegt. Hierfür wurden die Stämme in XYGly angezogen und kurz vor dem Mikroskopieren SD++ Agar auf die Zellen gelegt. Innerhalb von 3 min erfolgte sowohl im Wildtyp als auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante der Import des zuvor im Cytoplasma lokalisierten Proteins Mig1. In dieser Zeitreihe konnte zwischen Mutante und Wildtyp kein Unterschied im Import festgestellt werden, nur in der Mig1-Proteinmenge (Abbildung 4-18 D).

In der Mikroskopie wurde deutlich weniger Kern-lokalisiertes Mig1 in der eIF2-Mutante detektiert. Um die Gesamtproteinmenge von Mig1 zu bestimmen, wurde eine Western-Analyse durchgeführt. Für die Analyse wurden zwei unterschiedliche Medien verwendet. Wenn den Zellen keine Glukose zur Verfügung steht, wird Mig1 phosphoryliert.

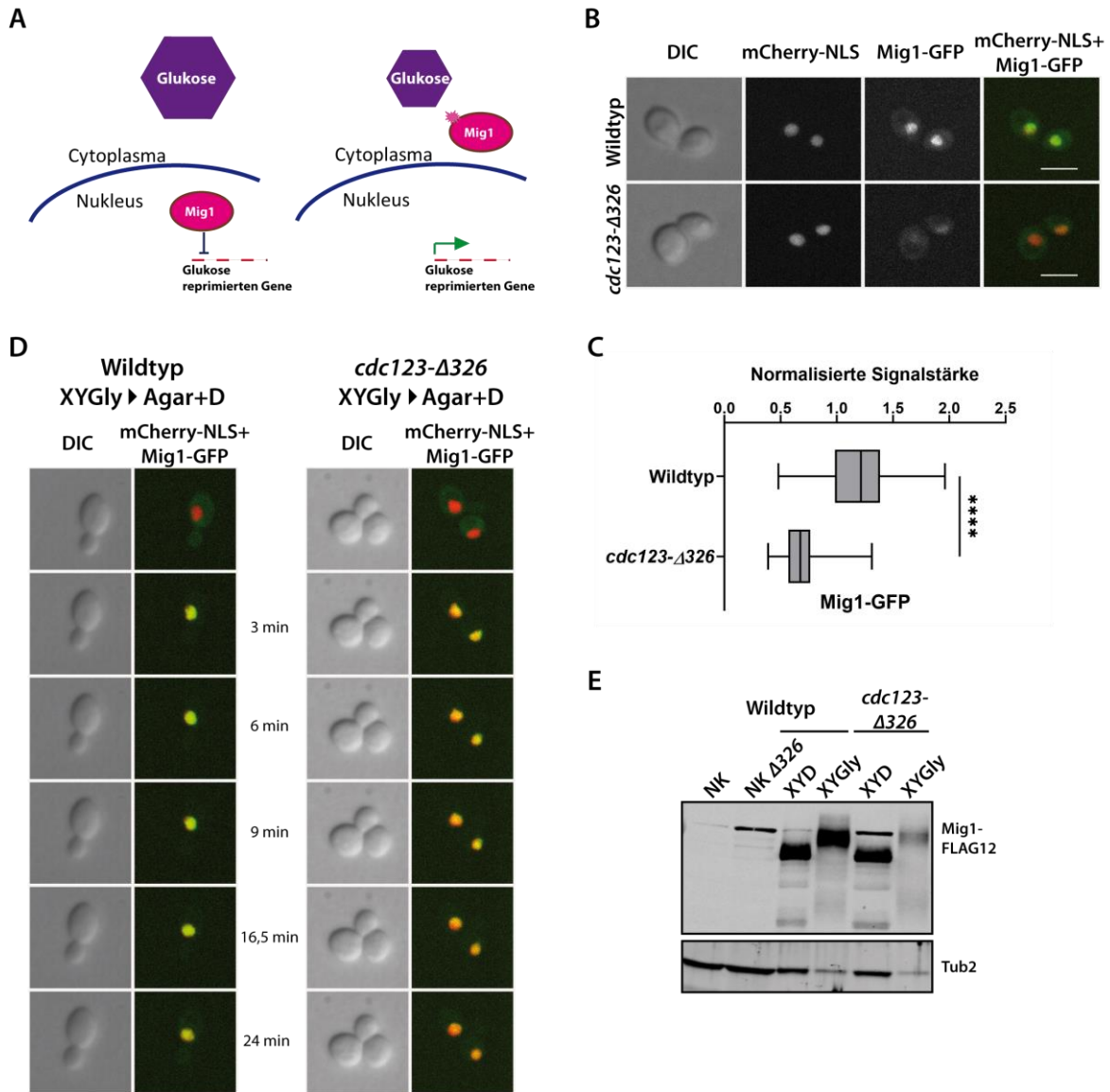


Abbildung 4-18: Analyse von Mig1 in eIF2-Mutanten. **A**, Schematische Darstellung der Mig1 Lokalisation abhängig vom Glukose Status in der Zelle. Bei ausreichender Glukosemenge ist Mig1 im Kern lokalisiert und reprimiert Gene. Nachdem Glukose verbraucht worden ist, wird Mig1 phosphoryliert (rosa Stern) und aus dem Kern exportiert, wodurch die Targetgene exprimiert werden können. **B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W16757 (*mCherry-NLS MIG1-GFP*) und W16759 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS MIG1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. **C**, Für die Quantifizierung von Mig1 im Kern wurden je 50 Zellen verwendet und von der integrierten Dichte von Kern- und GFP-Signal jeder Zelle der Quotient gebildet. Nach dem Shapiro-Wilk Test lag keine Normalverteilung vor, weshalb die statistische Auswertung mithilfe des Mann-Whitney Tests erfolgte. Signifikanz: **** $p < 0,0001$ **D**, Die gleichen Stämme aus B wurden über Nacht bei 25°C in XYGly kultiviert. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Mikroskopie unter einen SD++ Agar präpariert. Am Anfang wurde alle 3 min dann alle 7,5 min eine Aufnahme getätigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **E**, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bzw. XYGly bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: K699 (NK), W15596 (NK *cdc123-Δ326*), W18340 (*MIG1-FLAG12*), W18342 (*cdc123-Δ326 MIG1-FLAG12*). Für die Western-Analyse wurden 1 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Mig1 mit dem FLAG-spezifischen Antikörper α-FLAG M2. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen. Die Detektion erfolgte hier mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2).

In einer Studie wurde gezeigt, dass diese posttranslationale Modifikation nach der Proteinauf-trennung feststellbar ist (Shashkova et al., 2017). In Anwesenheit von Glycerin statt Glukose im Medium konnte in beiden Genotypen eine Verschiebung des Mig1-Signals detektiert werden. In der eIF2-Mutante war jedoch weniger Gesamtprotein vorhanden, weshalb das Signal schwächer vorlag (Abbildung 4-18 E). Die Proteinmenge von Mig1 wurde in Zellen analysiert, die mit Glukose gewachsen sind. Nach der Quantifizierung der Zellen konnte in der Mutante eine leichte Reduktion von Mig1 ermittelt werden (83% Mig1-Signal in *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp, Abbildung 4-18 E). Die deutliche Abnahme des im Kern-lokalisierten Mig1-Signals lässt sich somit nur bedingt mit einer verringerten Proteinmenge erklären.

Liegt Mig1 nicht im Nukleus vor, erfolgt eine Derepression der Targetgene (Alipourfard et al., 2019). Glukose-reprimierte Gene können daraufhin exprimiert werden. Es stellte sich somit die Frage, inwieweit die verminderte Mig1-Menge im Nukleus zu einem verlangsamten Wachstum und zu einer Verschiebung des Zellzyklus in Richtung 1C-Zellen beiträgt. Um den Einfluss des Repressors näher zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten (*mig1Δ*) hergestellt. Im Wildtyp hatte die Deletion auf den Zellzyklus und auf das Zellwachstum keinen Effekt (Abbildung 4-19). In *cdc123-Δ326 mig1Δ* konnten etwas mehr 1C-Zellen und ein langsames Zellwachstum im Vergleich zur Einfachmutante festgestellt werden (1C-Zellen in *cdc123-Δ326* 36% und in *cdc123-Δ326 mig1Δ* 41%, Abbildung 4-19 C). Der Verlust von *MIG1* trägt demnach nicht zu einem veränderten Zellzykluseintritt bei.

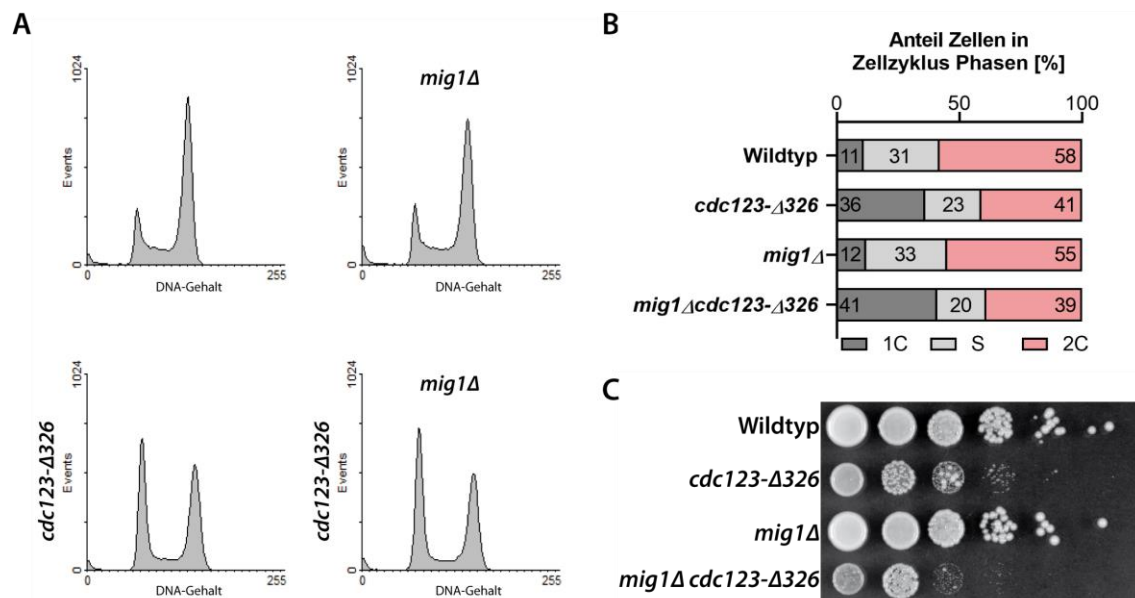


Abbildung 4-19: Zellzyklus und Wachstum nach Deletion von *MIG1*. Die Stämme K699 (Wildtyp) W15596 (*cdc123-Δ326*) W17851 (*mig1Δ*) und W17853 (*cdc123-Δ326 mig1Δ*) wurden für die Analysen verwendet. **A**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und die exponentiell wachsenden Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflussszytometer CyFlow Space. **B**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase). **C**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert.

Während des Wachstums in Glukose liegt Mig1 dephosphoryliert im Kern vor und ist für die Repression von relevanten Genen verantwortlich (Busti et al., 2010; Rolland et al., 2002). Nach dem Verbrauch der fermentierbaren Kohlenstoffquelle wird Mig1 phosphoryliert und aus dem Kern, vermittelt durch Msn5, exportiert (Hedbacker & Carlson, 2009). Die Phosphorylierung von Mig1 erfolgt durch die Serin-Threonin-Kinase Snf1. Ihre Aktivität wird durch Glukose gesteuert (Treitel et al., 1998; Abbildung 4-20 A). Wenn Glukose im Medium nur noch in geringen Mengen zur Verfügung steht, wird Snf1 durch seine „*upstream*“-Kinasen phosphoryliert und ändert dadurch seine Lokalisation (Vincent et al., 2001; Kayikci & Nielsen, 2015). In der *cdc123-Δ326*-Mutante konnte weniger Mig1 im Nukleus detektiert werden, was die Frage aufwarf, ob eine erhöhte Aktivität von Snf1 für die veränderte Lokalisation des Transkriptionsrepressors verantwortlich ist. Hierfür wurden Stämme hergestellt, die neben dem GFP markiertem Mig1 noch eine Deletion von *SNF1* trugen. Mithilfe der neu hergestellten Stämme konnte untersucht werden, ob durch den Verlust der Kinase-Aktivität die Kernlokalisierung von Mig1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante wieder auf das Wildtyp-Niveau angehoben werden kann. In Abbildung 4-20 B-D wird deutlich, dass in der *cdc123-Δ326 snf1Δ*-Mutante mehr Mig1 im Kern sowohl sichtbar als auch quantitativ messbar im Vergleich zu *cdc123-Δ326*-Mutante vorlag. Der Unterschied zwischen der Einfach- (*snf1Δ*) und Doppelmutante (*cdc123-Δ326 snf1Δ*) ist zwar signifikant, dennoch nicht so groß wie beim Vorhandensein der Kinase (n=50 Zellen in *snf1Δ* Mittelwert 1 und in *cdc123-Δ326 snf1Δ* Mittelwert 0,9, Abbildung 4-20 C). Eine Vermutung wäre, dass sich der hier gefundene Unterschied durch die verringerte Mig1 Gesamtproteinmenge in den eIF2-Mutante erklären lässt (vgl. Abbildung 4-18 E). Für den direkten Vergleich der erhöhten Kernlokalisierung von Mig1 in der *cdc123-Δ326 snf1Δ*- im Vergleich zur *cdc123-Δ326*-Mutante sind die Werte aus Abbildung 4-18 C und aus Abbildung 4-20 C zusammengefasst (Abbildung 4-20 D). Zwischen beiden Mutanten konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine erhöhte Snf1-Aktivität in der eIF2-Mutante hin.

Für die Untersuchung des Einflusses von Snf1 auf das Wachstum und auf den Zellzykluseintritt der eIF2-Mutante wurde die *SNF1*-Deletion näher untersucht. Die Deletion von *SNF1* führt sowohl im Wildtyp als auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante zu einem verspäteten Zellzykluseintritt. Auch das Wachstum dieser Stämme war geringfügig beeinträchtigt (1C-Zellen im Wildtyp 11%, *snf1Δ* 23%, *cdc123-Δ326* 37% und in *cdc123-Δ326 snf1Δ* 44%, Anhang Abbildung 10-6 A-C). Dieses Ergebnis deutet auf weitere Snf1-Funktionen hin, die nicht direkt mit dem Glukosestoffwechsel einhergehen. So wurde in der Literatur über eine Beteiligung der Proteinkinase in zelluläre Entwicklungsprozessen berichtet (Hedbacker & Carlson, 2009).

Wenn den Zellen wenig Glukose zur Verfügung steht, wird Snf1 aktiviert, ändert seine Lokalisation und phosphoryliert daraufhin Mig1 im Nukleus (Vincent et al., 2001; Kayikci & Nielsen, 2015). Um die Lokalisation von Snf1 zu untersuchen, wurde eine GFP markierte Snf1-Version im Wildtyp und in der *cdc123-Δ326*-Mutante hergestellt. Hierfür wurden unterschiedliche Kohlenstoffquellen herangezogen (XYD und XYGly). Eine Kernlokalisierung von Snf1 konnte nur

in Zellen, die mit Glycerin gewachsen sind, detektiert werden (Anhang Abbildung 10-6 D). Die Lokalisation von Snf1 war somit in der eIF2-Mutante nicht messbar verändert.

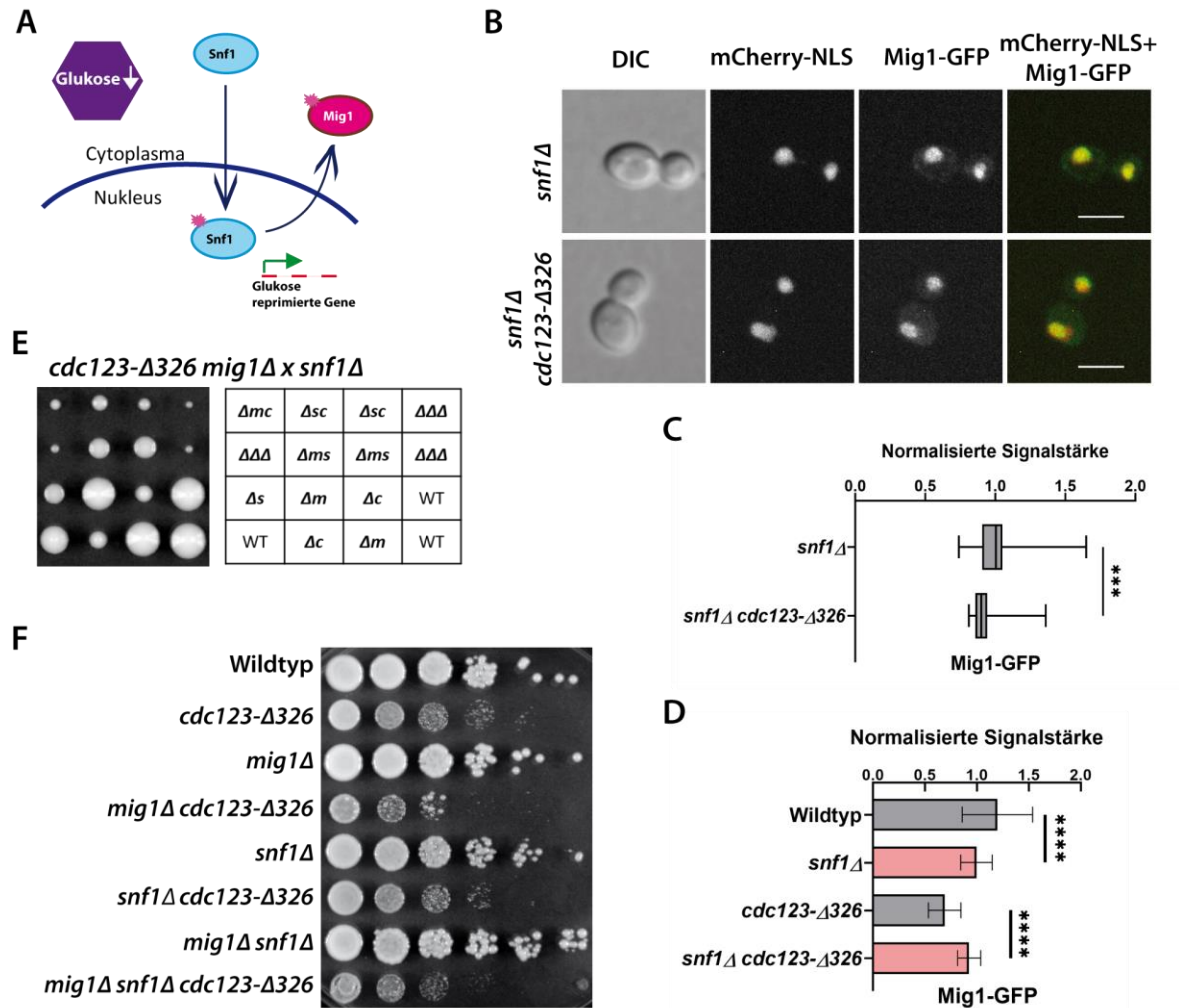


Abbildung 4-20: Analyse der Mig1 Regulation durch Snf1 in *cdc123-Δ326*. **A**, Schematische Darstellung der Mig1 Regulation durch Snf1, wenn Glukose im Medium limitiert vorliegt. Mig1 wird durch Snf1 phosphoryliert und aus dem Kern exportiert. Die durch Mig1 reprimierten Gene können exprimiert werden. **B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W16771 (*snf1Δ mCherry-NLS MIG1-GFP*) und W16772 (*cdc123-Δ326 snf1Δ mCherry-NLS MIG1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **C**, Für die Quantifizierung von Mig1 im Kern wurden je 50 Zellen zufällig ausgewählt. Es wurde von der integrierten Dichte, von Kern- und GFP-Signal jeder Zelle, der Quotient gebildet. Die statistische Auswertung erfolgte, mithilfe des Mann-Whitney Test. Signifikanz: *** $p < 0,0002$. **D**, Die zuvor ermittelten Quotienten aus C und Abb. 4-12 C wurden zusammenfassend dargestellt *snf1Δ* (hellrot), Wildtyp (grau). Signifikanzen ergeben sich aus den zuvor beschriebenen Berechnungen **** $p < 0,0001$. **E**, Tetraden-Analyse von heterozygot diploiden Stämmen. Die daraus resultierenden haploiden Nachkommen wurden auf einer XYD-Platte vereinzelt, bei 30°C inkubiert und der Genotyp bestimmt. Dargestellt sind jeweils vier repräsentative Tetraden in vertikaler Richtung. Tetraden der Kreuzung von W17853 (*cdc123-Δ326 mig1Δ*) und W16736 (*snf1Δ*). Δm = *mig1Δ*; Δc = *Δ326*; Δsc = *snf1Δ-Δ326*; Δmc = *mig1Δ-Δ326*; ΔΔΔ = *mig1Δ snf1Δ-Δ326*. **F**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme für die Kreuzung aus E, sowie K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*) W17851 (*mig1Δ*), W16774 (*cdc123-Δ326-HA3 snf1Δ*), W18411 (*mig1Δ snf1Δ*) und W18412 (*cdc123-Δ326-HA3 mig1Δ snf1Δ*) über Nacht bei 30°C inkubiert. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden anschließend auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert.

Die Daten deuten auf eine verstärkte Snf1-Aktivität in den eIF2-Mutanten hin, da weniger Mig1 im Kern lokalisiert vorlag. Um eine Funktionsbeziehung zwischen dem Repressor Mig1 und der Snf1-Kinase zu erhalten, wurden beide codierenden Gene deletiert und mithilfe der Tetraden-Analyse untersucht (Abbildung 4-20 E). Diese ergab, dass die Einzelmutante *mig1Δ* keinen sichtbaren Effekt in der Koloniegröße zur Folge hatte. Die Doppelmutante *cdc123-Δ326 mig1Δ* hingegen bildete kleinere Kolonien. Im Vergleich dazu war der Effekt bei *snf1Δ* schon deutlich zu sehen und veränderte sich nur geringfügig in der *cdc123-Δ326 snf1Δ*-Mutante. Die Deletion von *SNF1* hat somit einen stärkeren Effekt auf die Koloniegröße im Vergleich zu *mig1Δ*-Zellen.

Auch die Doppelmutation von *SNF1* und *MIG1* veränderte die Koloniegröße der Zellen nicht im Vergleich zu den *snf1Δ*-Zellen. Der größte Effekt geht mit der Kombination aus *cdc123-Δ326 mig1Δ* einher und wurde zusätzlich durch *snf1Δ* verstärkt.

Im Wachstumstest wurde ebenfalls deutlich, dass die *mig1Δ*-Zellen keinen sichtbaren Nachteil zum Wildtyp hatte, wohingegen die Doppelmutante *cdc123-Δ326 mig1Δ* einen Effekt im Vergleich zur Einfachmutante *cdc123-Δ326* zeigte (Abbildung 4-20 F). Dies deutet daraufhin, dass Mig1 in der eIF2-Mutante einen gewissen Beitrag leistet und der Verlust sich zusätzlich auf das Wachstum auswirkt. Der Verlust von Snf1 führt schon im Wildtyp zu einem leichten Wachstumsdefizit, dieses wurden in der eIF2-Mutante nicht verstärkt. Das Vorhandensein der Kinase hat demnach keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutante.

In der Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass weniger Kern-lokalisiertes Mig1 in den Zellen der Mutanten vorlag, dies jedoch nicht mit einer geringeren Gesamtproteinmenge erklärbar war (vgl. Abbildung 4-18 B, E). Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein kompletter Verlust von *MIG1* in der *cdc123-Δ326*-Mutante die Zellen im Wachstum deutlich beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass Mig1 für das Wachstum der Mutante wichtig ist. Durch den Verlust von Snf1 konnte in der eIF2-Mutante wieder deutlicher mehr Mig1 im Nukleus gefunden werden. Es besteht die Annahme, dass die Aktivität von Snf1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante erhöht vorliegt.

Die Regulation von Snf1 erfolgt zum einen durch die drei „*upstream*“-Kinasen und zum anderen durch die Protein-Phosphatase 1 Glc7-Reg1 (Sanz et al., 2000). Bei ausreichender Glukosemenge interagiert die regulatorische Untereinheit Reg1 mit Snf1. Dies führt zur Dephosphorylierung und zur damit verbundenen Inaktivierung von Snf1. Unter diesen Bedingungen liegt Mig1 im Nukleus vor und reprimiert die relevanten Gene (Abbildung 4-21 A). Unter Glukose-Bedingungen konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Deletion von *REG1* die Snf1-Kinase hyperaktiv vorliegt (Hedbacker & Carlson, 2009). Die Lokalisation von Mig1 wird ebenfalls durch Reg1 beeinflusst. Bei ausreichender Glukosemenge im Medium wird auch Mig1 durch die Phosphatase dephosphoryliert und wieder in den Kern importiert (Shashkova et al., 2017). Ist die Glukose im Medium aufgebraucht, liegt Glc7-Reg1 inaktiv vor und Snf1 wird nicht dephosphoryliert (Hedbacker & Carlson, 2009). Die nun aktive Kinase phosphoryliert

Mig1 und es erfolgt eine Derepression der relevanten Gene. Da Reg1 den Phosphorylierungsstatus von Snf1 und Mig1 beeinflusst, stellte sich die Frage, ob eine Deletion von *REG1* zu einer veränderten Lokalisation von Mig1 führen würde. Zu diesem Zweck wurden Stämme generiert, in denen Mig1 GFP-markiert war und gleichzeitig *REG1* deletiert wurde. In der Mikroskopie konnte ein deutlicher Kern-Ausschluss von Mig1-GFP in *reg1Δ* festgestellt werden (Abbildung 4-21 B oben). Bei gleichzeitiger Deletion von *SNF1* wurde die Kernlokalisierung von Mig1-GFP wiederhergestellt (Abbildung 4-21 B unten). In der *cdc123-Δ326*-Mutante wurde ähnliche Ergebnisse festgestellt (vgl. Abbildung 4-18 B, Abbildung 4-20 B), allerdings wurde hier weniger cytoplasmatisches Mig1-GFP detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in der eIF2-Mutante eine verminderte Reg1-Menge Auslöser für eine die verringerte Mig1-Kernlokalisierung sein könnte.

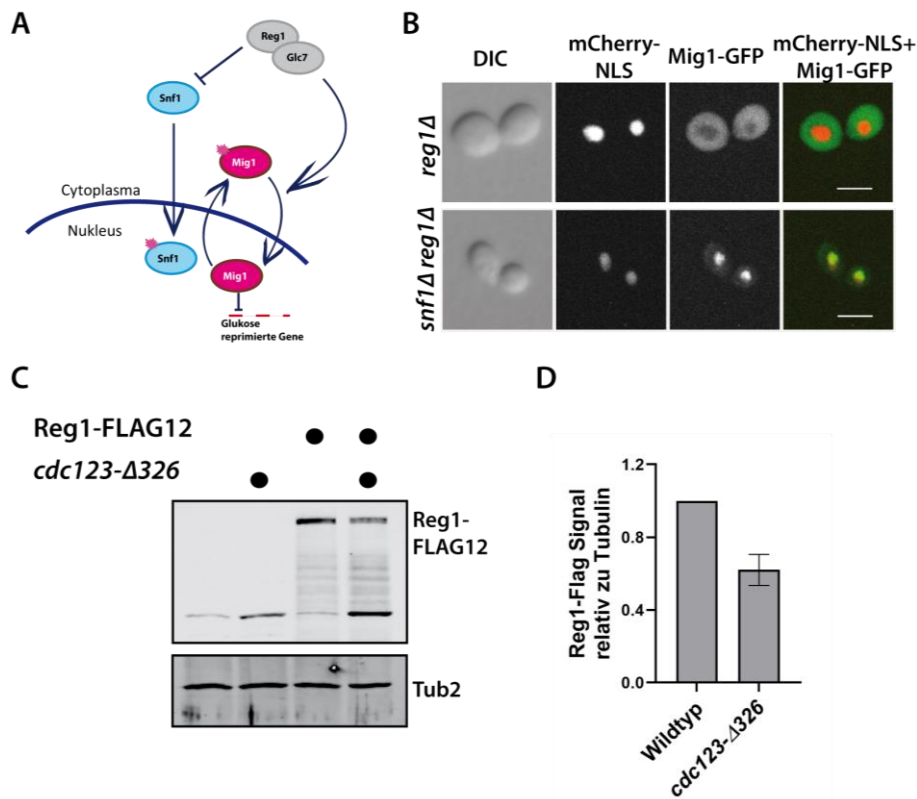


Abbildung 4-21: Veränderte Reg1-Menge in *cdc123-Δ326*. **A**, Schematische Darstellung der Regulation von Snf1 und Mig1 durch Glc7-Reg1 Protein-Phosphatase 1. Snf1 wird dephosphoryliert und inaktiv gehalten. Mig1 bleibt im Kern und reprimiert seine Targetgene. Die Phosphatase ist bei hoher Glukosemenge auch für die Relokalisation von Mig1 in den Nukleus verantwortlich. **B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17848 (*reg1Δ mCherry-NLS MIG1-GFP*) und W18092 (*reg1Δ snf1Δ mCherry-NLS MIG1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm zwischen den Ebenen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **C**, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: W18087 (*REG1 FLAG12*) und W18089 (*cdc123-Δ326 REG1 FLAG12*). Für die Western-Analyse wurden 2 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis für Reg1 erfolgte mit einem FLAG-spezifischen Antikörper α-FLAG M2. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen. Hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2). **D**, Mithilfe der Image Studio Software wurde die Bandenintensität von Reg1-FLAG und Tub2 ermittelt und in Beziehung gesetzt. Die *cdc123-Δ326* berechneten Werte wurden daraufhin auf den Wildtyp normiert (n=3).

Um zu untersuchen, ob die Proteinmenge von Reg1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante verändert vorliegt, wurde *REG1* mit der Sequenz des FLAG12-Epitops fusioniert und in der Western-Analyse untersucht. In Abbildung 4-21 C-D ist eine deutliche Verringerung von Reg1 erkennbar. (n=3 in *cdc123-Δ326* Mittelwert 62% Reg1 im Vergleich zum Wildtyp 100%). Die reduzierte Reg1-Proteinmenge in der *cdc123-Δ326*-Mutante könnte eine erhöhte Snf1-Aktivität und gleichzeitig die verringerte Mig1-Menge im Kern erklären. Erstaunlicherweise lieferten die RNA-Seq-Daten in den eIF2-Mutanten eine verstärkte Expression von *REG1* (mRNA „Reads“ im Wildtyp betrug: 890 und in *cdc123-Δ326* 1124). Es könnte demnach sein, dass *REG1* zu den mRNAs gehört, die schlecht translatiert werden. Eine weitere Vermutung wäre, dass das Protein in der Mutante instabiler ist und schneller degradiert wird.

In den eIF2-Mutanten konnte weniger Reg1 detektiert werden. Es stellte sich somit die Frage, welchen Einfluss eine Deletion von *REG1* auf den Wildtyp sowie auf die eIF2-Mutante hat. Hierfür wurden die Stämme miteinander gekreuzt. Die Tetraden-Analyse hat gezeigt, dass eine Doppeldeletion von *REG1* und *cdc123-Δ326* zu einem synthetischen Effekt führt (Abbildung 4-22 A). Obwohl in der Tetraden-Analyse Mikrokolonien sichtbar waren, konnte die Doppelmutante nicht in Flüssigkultur angezogen werden. In den Mutanten konnte gezeigt werden, dass weniger Reg1 vorliegt (Abbildung 4-21 C), bei einem kompletten Proteinverlust sind die Zellen nicht lebensfähig. Die Untersuchung der Einzelmutante (*reg1Δ*) lieferte zudem ein vermindertes Wachstum und eine Verschiebung des Zellzyklus in Richtung 1C-Zellen (1C-Zellen im Wildtyp 11%, in *cdc123-Δ326* 38% und in *reg1Δ* 19%, Abbildung 4-22 E-F). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass *REG1* für ein wildtypisches Wachstum notwendig ist. Eine verminderte Menge von Reg1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante könnte somit mit verantwortlich sein für den verlangsamten Zellzykluseintritt. Wird zusätzlich zu *REG1* auch die *SNF1* deletiert, konnte in der Doppelmutante im Vergleich zu *reg1Δ* ein verbessertes Wachstum festgestellt werden. Auch die Kolonien von *reg1Δ snf1Δ* waren in den Tetraden größer als die der jeweiligen Einzelmutationen (Abbildung 4-22 B). Zusätzlich war der Stamm *cdc123-Δ326 reg1Δ snf1Δ* wieder lebensfähig (Abbildung 4-22 B-D). In der Zellzyklus-Analyse konnte in der Doppelmutante *reg1Δ snf1Δ* weniger 1C im Vergleich zu *reg1Δ* detektiert werden, vergleichbar viele wie in der *snf1Δ*-Mutante (1C-Zellen in *reg1Δ* 29%, *snf1Δ* 23% und *reg1Δ snf1Δ* 23%, Abbildung 4-22 E,F). In der Dreifachmutante (*cdc123-Δ326 reg1Δ snf1Δ*) wurden deutlich mehr 1C-Zellen detektiert, diese waren jedoch im Gegensatz zu der *cdc123-Δ326 reg1Δ*-Mutante lebensfähig (1C-Zellen in *cdc123-Δ326* 38%, *cdc123-Δ326 reg1Δ snf1Δ* 51%, Abbildung 4-22 E,F).

Es kann vermutet werden, dass durch die Deletion von *REG1* eine erhöhte Snf1-Aktivität vorliegt. Dies führt zu einem Wachstumsdefizit und verspäteten Zellezykluseintritt. Bei gleichzeitiger Deletion hebt sich dieser Effekt wiederum auf. In der eIF2-Mutante wäre demnach durch die verminderte Reg1-Menge eine erhöhte Snf1-Aktivität annehmbar, welches wiederum zu einem verlangsamten der Zellezykluseintritt führt.

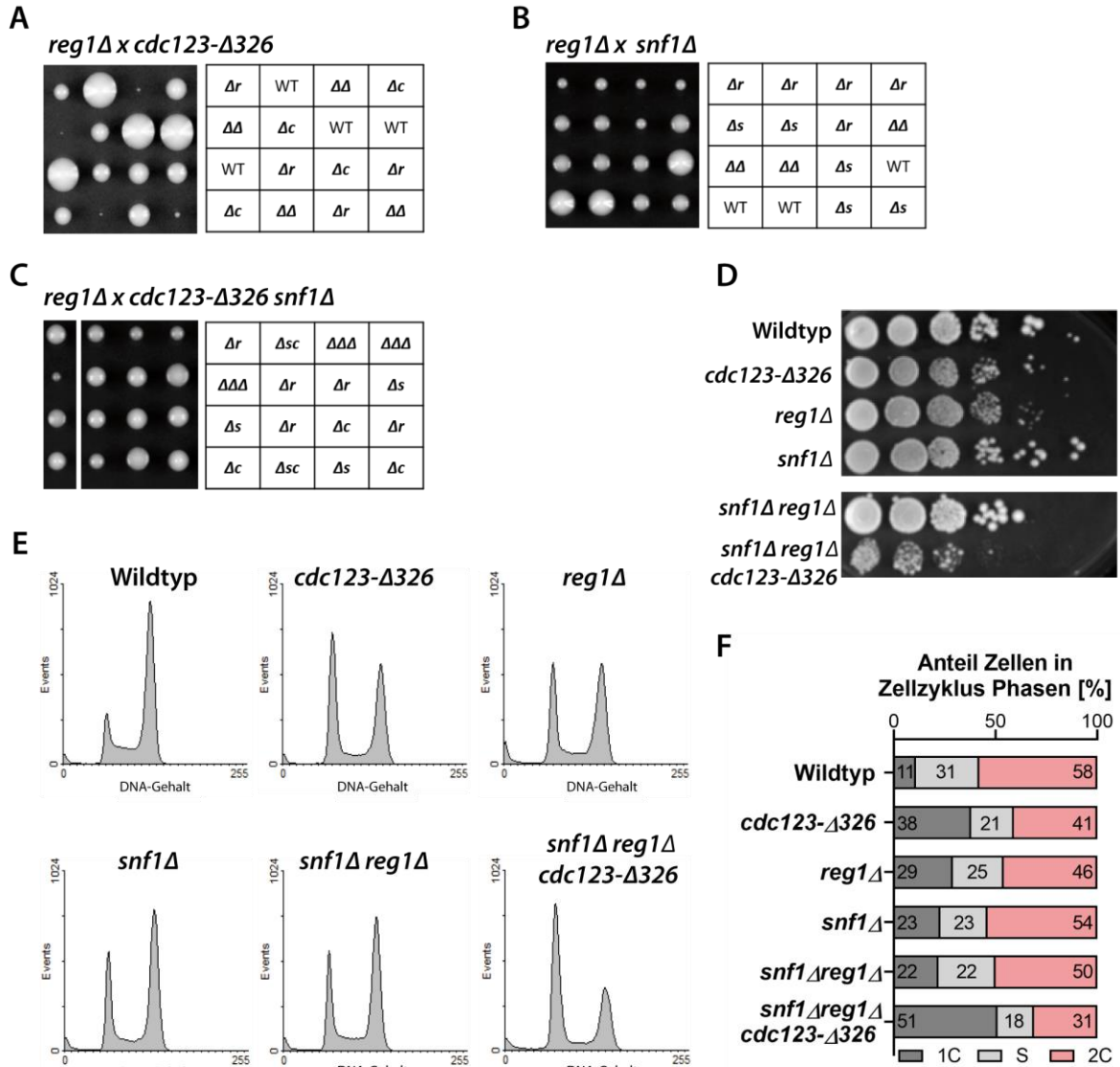


Abbildung 4-22: REG1 vermittelter Wachstumseffekt. **A-C,** Tetraden-Analyse von heterozygot diploiden Stämmen. Die daraus resultierenden haploiden Nachkommen wurden auf einer XYD-Platte vereinzelt, bei 30°C inkubiert und der Genotyp bestimmt. Dargestellt sind jeweils vier repräsentative Tetraden in vertikaler Richtung **A,** Tetraden der Kreuzung von W17847 (*reg1Δ*) und W15595 (*cdc123-Δ326*). $\Delta r = \Delta reg1$; $\Delta c = cdc123-Δ326$; $\Delta\Delta = cdc123-Δ326 \Delta reg1$. **B,** Tetraden der Kreuzung von W17847 (*reg1Δ*) und W16737 (*snf1Δ*). $\Delta r = \Delta reg1$; $\Delta s = \Delta snf1$; $\Delta\Delta = \Delta reg1 \Delta snf1$. **C,** Tetraden der Kreuzung von W17847 (*reg1Δ*) und W16775 (*cdc123-Δ326 snf1Δ*) $\Delta r = \Delta reg1$; $\Delta s = \Delta snf1$; $\Delta sc = cdc123-Δ326 \Delta snf1$; $\Delta\Delta\Delta = cdc123-Δ326 \Delta reg1 \Delta snf1$. **D,** Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W17847 (*reg1Δ*), W16736 (*snf1Δ*), W18091 (*snf1Δ reg1Δ*) und W18093 (*cdc123-Δ326 snf1Δ reg1Δ*) über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **E,** Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus D über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusssyztometer CyFlow Space. **F,** Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Die vorangegangenen Daten haben gezeigt, dass die regulatorische Untereinheit der PP1, Reg1, einen Einfluss auf die eIF2-Mutante hat. Durch die Deletion von *REG1* war die eIF2-Mutante nicht mehr lebensfähig. Zusätzlich wurde in der *cdc123-Δ326*-Mutante weniger Reg1 gefunden.

Es stellte sich somit die Frage, ob eine Überexpression von *REG1*, der eIF2-Mutante helfen würde, schneller in den Zellzyklus einzutreten zu können. Zudem wurde die 5'-Region mit einer genomweiten Studie verglichen. In dieser Studie wurde in Hefezellen die Transkriptionsstartstellen bestimmt sowie die Länge der 5'-Region definiert (Heyer & Moore, 2016; Nagalakshmi et al., 2008). Aus dieser Publikation ergab sich, dass der 5'-*Leader* von *REG1* 318 Basen lang war (Abbildung 4-23 A-B). Die mittlere Länge der 5'-Region in der Hefe beträgt $95,5 \text{ Basen} \pm 116,8 \text{ Basen}$ (Lin & Li, 2012). Somit ist die Länge des 5'-*Leaders* von *REG1* deutlich höher als der Mittelwert. Die lange 5'-Region könnte auf eine regulierte Translation hindeuten. Mithilfe des Genom-Browsers konnten die „*Reads*“ vom Wildtyp und der Mutante übereinander aufgetragen werden. Bei der Betrachtung der RNA-Seq-Daten wurde neben der leicht erhöhten Transkriptmenge der eIF2-Mutante ($\log_2$ Veränderung 0,33), zusätzlich „*Reads*“ in dem 5'-*Leader* detektiert (Abbildung 4-23 A). Die in der Literatur angegebene Transkriptionsstartstelle bei 318 Basen konnte ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 4-23 A, schwarzer Strich). Außerdem wurden weitere „*Reads*“ stromaufwärts dieser Startstelle gefunden. Dies deutet daraufhin, dass der Start von *REG1* entweder an einer anderen Stelle ist oder dass mehrere Transkriptionsstartstellen vorhanden sind.

Für die Untersuchung der verstärkten Expression von *REG1* wurde im endogenen Gen der eigene Promotor durch einen *TEF2*-Promotor ausgetauscht. Hinter dem Promotor wurde die Sequenz des HA-Epitops inseriert, um die Proteinmenge nachweisen zu können. Mithilfe dieser Methode konnte nicht nur die verstärkte Expression von *REG1* in den Mutanten analysiert werden. Es war zusätzlich möglich, durch den Austausch der 5'-Region eine denkbare Translationsregulation zu untersuchen.

Die Analyse der Proteinmenge ergab, dass trotz des stärkeren Promotors weiterhin deutlich weniger Reg1 in der eIF2-Mutante vorhanden war (*cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* 16% Reg1-Menge im Vergleich zu 100% *pTEF2-REG1*, Abbildung 4-23 C-D, zwei rechten Spuren). Bei der Betrachtung der Proben mit eigenem Promotor (Abbildung 4-23 C-D, zwei linken Spuren), war der Unterschied zwischen den zwei Genotypen (Wildtyp und *cdc123-Δ326*) deutlich geringer (Reg1-Menge Wildtyp 100% *cdc123-Δ326* 56%). Ein Vergleich der vier Ansätze untereinander war jedoch nicht möglich, da unterschiedliche Epitope (FLAG12 und HA3) zur Markierung genutzt wurden. Jedoch wird deutlich, dass in Zellen mit *pTEF2-REG1* mehr Reg1 im Vergleich zum Wildtyp detektiert wurde. In den *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1*-Zellen hingegen, war deutlich weniger Reg1 nachweisbar als in der *cdc123-Δ326*-Mutante (Abbildung 4-23 D).

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass trotz der verstärkten Expression von *REG1* in der eIF2-Mutante nicht mehr Reg1-Protein nachweisbar war. Die lange 5'-Region hat hier jedoch keinen Einfluss auf die verminderte Translation, da diese durch *pTEF2* substituiert wurde. In der eIF2-Mutante könnte demnach eine verringerte Stabilität des Proteins vorliegen, wodurch Reg1 in

der Mutante verstärkt degradiert wird. Es ist somit nicht anzunehmen, dass *REG1* translationell regulierte wird.

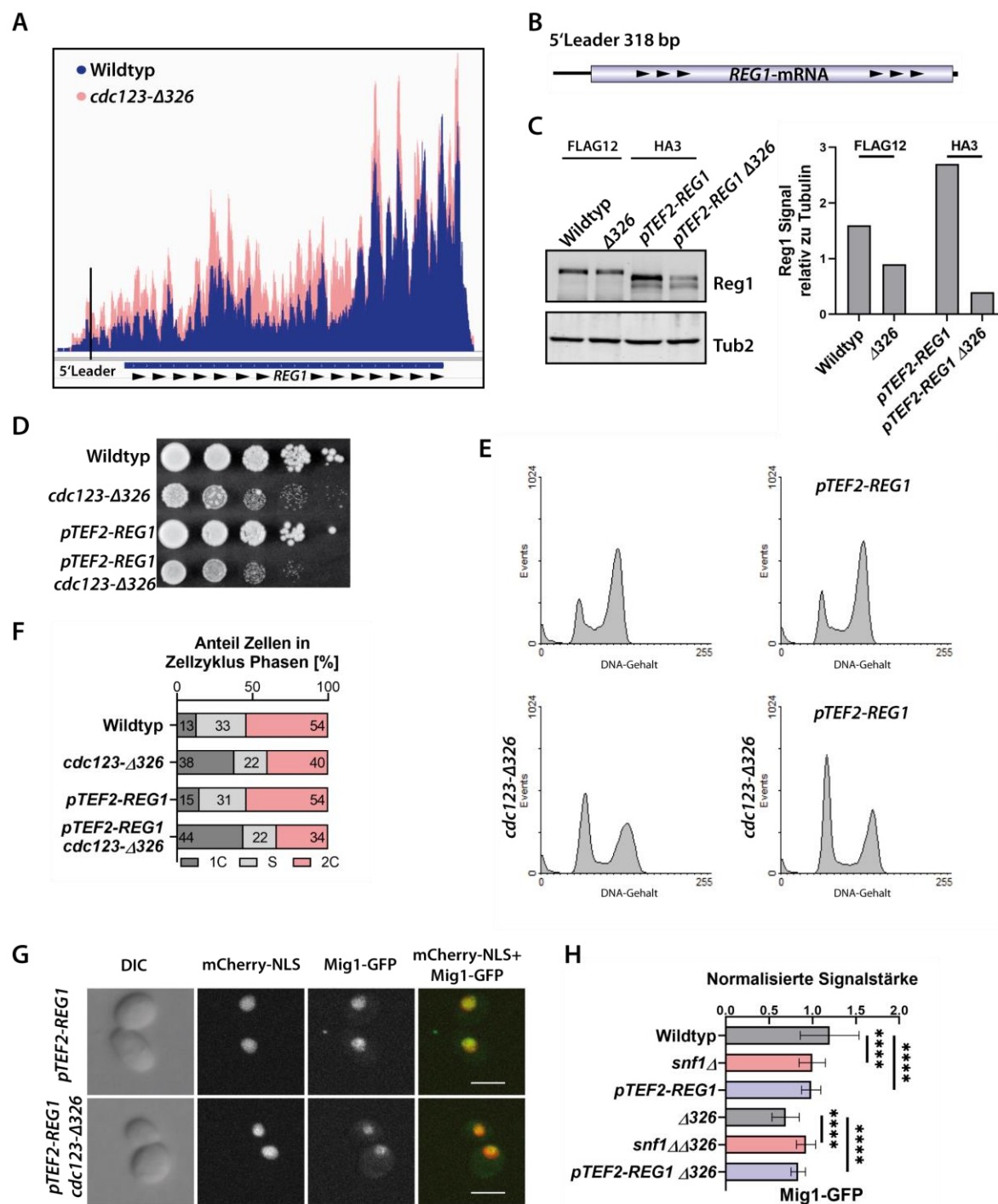


Abbildung 4-23: Analyse von *pTEF2-REG1* in *cdc123-Δ326*. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

A, Überlagerte mRNA „Reads“ von Wildtyp (K699), blau und den W15596 (*cdc123-Δ326*) hellrot am *REG1* Lokus. **B**, Schematische Darstellung der *REG1* mRNA mit dem 318 Basen langem 5'-*Leader*. **C**, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: W18087 (*REG1 FLAG12*) W18089 (*cdc123-Δ326 REG1 FLAG12*) W18363 (*pTEF2-3xHA-REG1*) und W18361 (*cdc123-Δ326 pTEF2-3xHA-REG1*) Für die Western-Analyse wurden 2 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Reg1 mit einem FLAG-spezifischen Antikörper α-FLAG M2, für *pTEF2*-Reg1 mit einem HA-spezifischen AK α-HA 12CA5. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen, hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2). Im Balkendiagramm ist die Quantifizierung, Reg1-Signal relativ zum Tubulin-Signal dargestellt. **D**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme aus A und W18089 (*cdc123-Δ326 REG1 FLAG12*), W18363 (*pTEF2-3xHA-REG1*) über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine Verdünnungsreihe, 1:10, erstellt wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **E**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus D über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „*Sytox Green*“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **F**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase). **G**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W18408 (*pTEF2-3xHA-REG mCherry-NLS MIG1-GFP*) und W18409 (*cdc123-Δ326 pTEF2-3xHA-REG mCherry-NLS MIG1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **H**, Für die Quantifizierung von Mig1 im Kern wurden je 50 Zellen zufällig ausgewählt. Von der integrierten Dichte, von *mCherry*- und GFP-Signal jeder Zelle, wurde der Quotient gebildet. Dargestellt sind Ergebnisse aus Abbildung 4-18 (grau) und Abbildung 4-20 (hellrot) und aus G in lila Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarten t-Test. Signifikanz: *** p<0,0002, **** p<0,0001.

Wie schon zuvor beschrieben, konnten die Proteinmengen der Ansätze mit den unterschiedlichen Promotoren nicht miteinander verglichen werden. Ob und wie viel mehr Reg1 in der *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1*-Mutante im Vergleich zur *cdc123-Δ326*-Mutante ist, kann mit diesen Proben nicht bestimmt werden. Da ein starker Promotor vor *REG1* inseriert wurde, kann eine verstärkte Expression des Gens angenommen werden. Um einen Einfluss der verstärkten *REG1*-Expression in den Mutanten zu bestimmen, wurden Wachstums- und Zellzyklus-Analysen durchgeführt. Der Wachstumstest ergab in den Stämmen mit *pTEF2-REG1*, im Wildtyp und auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante, eine leichte Wachstumsbeeinträchtigung (Abbildung 4-23 D). Dies konnte mit den Zellzyklus-Analysen bestätigt werden, wobei in Zellen mit *pTEF2-REG1* fast kein Unterschied zum Wildtyp detektiert werden konnte (Anteil der 1C-Zellen im Wildtyp 11%, *pTEF2-REG1* 15%). In der *cdc123-Δ326*-Mutante war der Anteil an 1C geringer als in der *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1*-Mutante (Anteil der 1C-Zellen *cdc123-Δ326* 38% und *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* 44%, Abbildung 4-23 E-F). Eine Überexpression von *REG1* führte somit nicht zu einem verbesserten Zellzykluseintritt. Jedoch sollte die Proteinmenge von Reg1 in den eIF2-Mutanten genauer untersucht werden, damit sichergestellt werden kann, dass mehr Reg1-Protein präsent ist.

Wie schon zuvor gezeigt, konnte in den eIF2-Mutanten eine veränderte Kernlokalisierung von Mig1 festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-18 B-C). Eine Annahme war, dass in den eIF2-Mutanten eine erhöhte Snf1-Aktivität vorlag. Die verminderte Reg1-Menge könnte der Auslöser

für eine erhöhte Snf1-Aktivität sein. Es stellte sich deshalb die Frage, ob sich durch Überexpression von *REG1* die Lokalisation von Mig1 in den eIF2-Mutanten verändert. Hierfür wurde erneut die Mig1-Lokalisation in der *cdc123-Δ326*-Mutante untersucht, jedoch diesmal mit einer verstärkten Expression von *REG1*. Nach der Quantifizierung von Mig1 ergab sich, dass, im Vergleich zu *pTEF2-REG1*, in der *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1*-Mutante weniger des Transkriptionsrepressors im Kern lokalisiert war ($n=50$ Zellen Quotient *pTEF2-REG1* 0,99, *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* 0,84, Abbildung 4-23 G-H lila). In Abbildung 4-23 H sind zusätzlich die Ergebnisse aus Abbildung 4-18 und Abbildung 4-20 aufgeführt, um einen direkten Vergleich zeigen zu können. Zusätzlich war auffällig, dass in den *pTEF2-REG1* Zellen weniger Mig1 im Kern lokalisiert war als im Wildtyp, allerdings ähnlich viel wie in *snf1Δ* (Wildtyp 1,20 grau in *snf1Δ* 1 hellrot und *pTEF2-REG1* 0,99 lila, Abbildung 4-23 H). Die Kombination *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* zeigte einen signifikanten Anstieg von Kern-lokalisiertem Mig1 im Vergleich zur Einfachmutante *cdc123-Δ326* (*cdc123-Δ326* 0,69 grau und in *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* 0,84 lila, Abbildung 4-23 H). Die Deletion von *SNF1* führte jedoch in der eIF2-Mutante zu geringfügig mehr Mig1 im Nukleus als die Überexpression von *REG1* (*cdc123-Δ326 snf1Δ* 0,93 und in *cdc123-Δ326 pTEF2-REG1* 0,84, Abbildung 4-23 H, hellrot & lila). Durch die Überexpression von *REG1* war es möglich, in den eIF2-Mutanten mehr Kern-lokalisiertes Mig1 zu detektieren. Dies war jedoch immer noch weniger als im Wildtyp und in der *snf1Δ*-Mutante. Es konnte nicht festgestellt werden, ob die Reg1-Menge für die Inhibierung der Snf1-Aktivität durch Dephosphorylierung hinreichend ist.

Die erhobenen Daten zur Lokalisation von Mig1 deuten auf eine erhöhte Aktivität von Snf1 in *cdc123-Δ326* hin, da im Nukleus weniger des Transkriptionsrepressors Mig1 vorliegt (vgl. Abbildung 4-18). Wenn Mig1 im Kern vorliegt, ist das Protein für die Reprimierung vieler Gene verantwortlich. Von diesen reprimierten Genen weisen einige in der *cdc123-Δ326*-Mutante ein erhöhtes Expressionslevel auf (vgl. Abbildung 4-17). Die Deletion von *SNF1* sowie die verstärkte Expression von *REG1* ermöglichte es, die Kernlokalisation von Mig1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante ganz bzw. teilweise wiederherzustellen (vgl. Abbildung 4-20, Abbildung 4-23). Mithilfe des Western-Blots konnte festgestellt werden, dass weniger Reg1 in der *cdc123-Δ326*-Mutante vorhanden war (vgl. Abbildung 4-21). Die hier zusammengefassten Ergebnisse lassen vermuten, dass in den eIF2-Mutanten die Snf1-Aktivität erhöht ist. Die verminderte Reg1-Menge in den Mutanten könnte der Auslöser für die erhöhte Aktivität sein. Dies wiederum führt zu weniger Mig1 im Nukleus und zur Derepression der Glukose-reprimierten Gene. Die reduzierte Menge von Reg1 in der eIF2-Mutante ist jedoch nicht mit einer regulierten Translation zu erklären. Eine verstärkte Degradation des Proteins könnte dafür verantwortlich sein. Dies würde auch erklären, warum die Überexpression von *REG1* in der *cdc123-Δ326*-Mutante keinen positiven Effekt auf das Wachstum und auf den Zellzykluseintritt hat.

4.4.2 Glukoseinduzierte Prozesse

Für *S. cerevisiae* ist die aerobe Gärung der bevorzugte Stoffwechselweg für die Energiegewinnung (de Alteriis et al., 2018; Galdieri et al., 2010; Özcan & Johnston, 1999). Wenn fermentierbare Kohlenstoffquellen vorhanden sind, werden diese durch Hexose-Transporter importiert. Welche Transporter exprimiert werden, hängt von der extrazellulären Glukosekonzentration ab (Reifenberger et al., 1997). Die Bäckerhefe hat 20 Gene, die für diese Transporter codieren. Sie haben eine unterschiedliche Substrat-Affinität und Spezifität. Während der Fermentation wird die Kohlenstoffquelle durch diversere Enzyme prozessiert (Abbildung 4-24 A). Es erfolgt eine Umsetzung von Pyruvat zu Ethanol, wobei NADH oxidiert wird (Sakihama et al., 2019). Steht der Hefe keine Glukose zur Verfügung, kann das produzierte Ethanol zusätzlich als Kohlenstoffquelle herangezogen werden (Rolland et al., 2002). Hierbei wird der Alkohol in mehreren Schritten verstoffwechselt und gelangt in die Mitochondrien, die Hefe respiriert. Im TCA-Zyklus wird daraufhin Malat generiert, welches im Cytoplasma den Gluconeogenese-Stoffwechselweg einschlägt. Dadurch kann wieder Glukose gewonnen werden (Wills, 1990). Atmung findet in der Bäckerhefe bei geringer Glukosekonzentration, wenn Sauerstoff vorhanden ist, ebenfalls statt. Die Glykolyse läuft bis zum Pyruvat, aber es wird kein Ethanol produziert (Käppeli, 1986). Das Pyruvat gelangt daraufhin in die Mitochondrien und wird dort weiter verstoffwechselt (Wills, 1990).

Mithilfe der RNA-Seq-Daten war es möglich, eine verstärkte Expression der atmungsspezifischen Gene zu detektieren (vgl. Abbildung 4-13). Gene, die, nachdem die Glukose verbraucht ist, dereprimiert werden, lagen in den eIF2-Mutanten ebenfalls verstärkt exprimiert vor (vgl. Abbildung 4-17). Es stellte sich die Frage, ob die Gene, die für Enzyme der Glykolyse codieren, in den eIF2-Mutanten auch verändert vorliegen. Die Untersuchung und der Vergleich der Gene mit den RNA-Seq-Daten ergab in der *cdc123-Δ326*- und *imt2-4Δ*-Mutante eine verminderte Expression (Abbildung 4-24 B). Zusätzlich wurden Gene analysiert, die für Enzyme der Glykolyse codieren, die allerdings bei einer niedrigeren Glukosekonzentration verstärkt exprimiert werden. Zu diesen Genen gehören *PYK2*, *PGM2* und *HXX1* (Boles et al., 1997; Fu et al., 1995; Rodríguez et al., 2001). In den eIF2-Mutanten konnte eine verstärkte Expression dieser Gene gefunden werden (Abbildung 4-24 C, lila). Für die Aufnahme von Glukose gibt es unterschiedliche Membrantransporter, die abhängig von der vorhandenen Glukosekonzentration stärker oder schwächer exprimiert werden (Kim et al., 2013). Diese Transporter wurden ebenfalls mit den Daten abgeglichen. Gene, die für Transporter mit hoher Affinität codieren, wurden in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert (Abbildung 4-24 C, hellblau). Der Transporter mit niedriger Affinität, *HXT1*, zeigte in *imt2-4Δ* eine verringerte Expression (Daten nicht gezeigt, log₂ *HXT1* -0,71 in *imt2-4Δ* im Vergleich zum Wildtyp). Gene, die für Enzyme der Gluconeogenese codieren, werden ebenfalls in den eIF2-Mutanten stärker exprimiert (Abbildung 4-24 C, dunkelblau).

Insgesamt zeigten die Daten, dass in den eIF2-Mutanten eine verstärkte Expression von Glukose-reprimierten Genen vorlag. Zudem werden einige Gene, die für glykolytische Enzyme codieren, reprimiert.

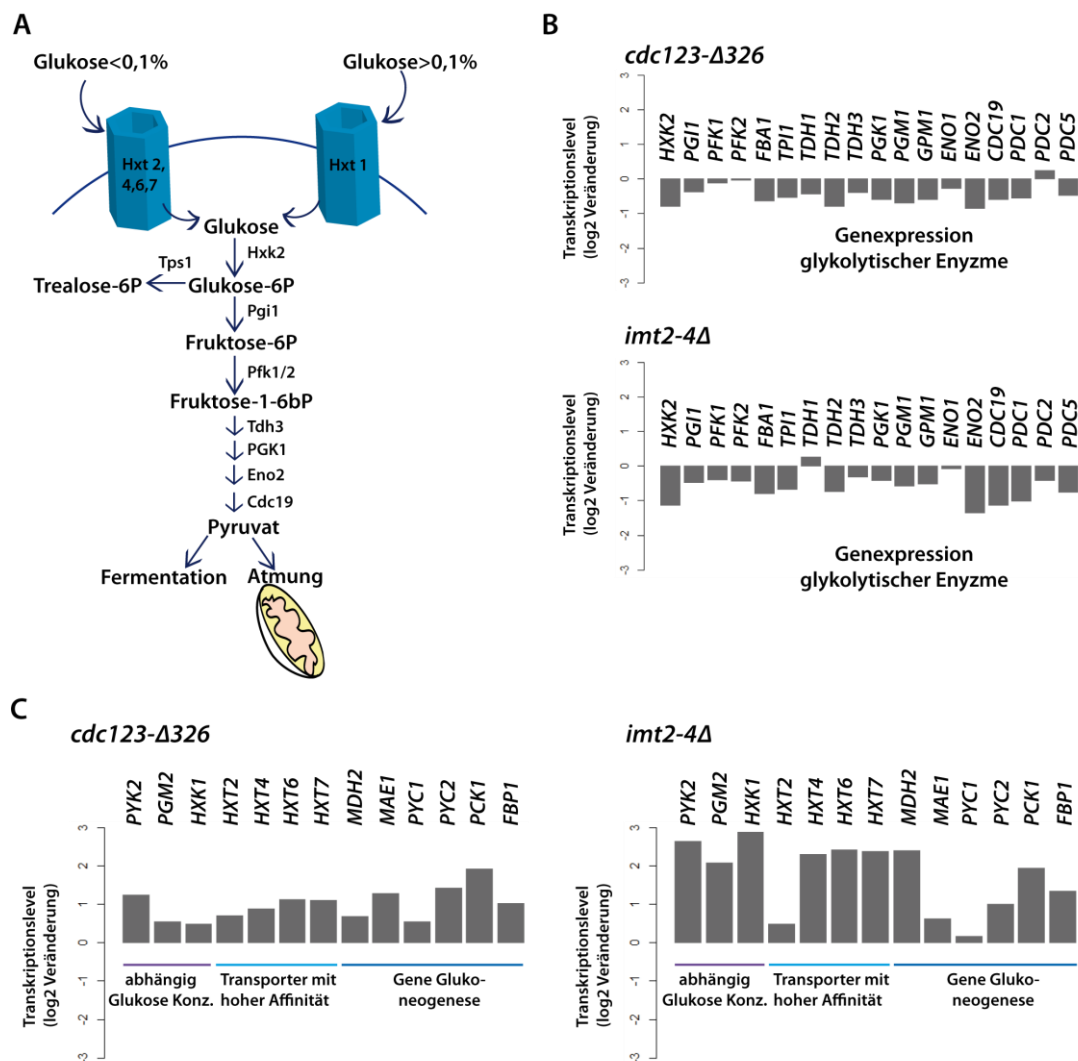


Abbildung 4-24: Die für Enzyme der Glykolyse-codierenden Gene sind in eIF2-Mutanten runterreguliert. **A**, Schematische Darstellung der Glykolyse mit den Schlüsselenzymen. Je nach Glukosekonzentration werden unterschiedliche Hexose-Transporter verstärkt exprimiert. Pyruvat wird entweder für die Fermentation oder für die Atmung genutzt. **B**, Log2 Veränderungen der mRNA „Reads“ von Wildtyp (K699) und den eIF2-Mutanten W15596 (*cdc123-Δ326*-oben) und W15766 (*imt2-Δ imt3-Δ imt4-Δ* unten). Im Barplot sind die Gene, die für Enzyme der Glykolyse codieren, aufgeführt. Hierbei wurden solche ausgewählt, die unter hoher Glukosekonzentration verstärkt exprimiert vorliegen. **C**, Log2 Veränderungen der gleichen Stämme wie in B. Im Barplot sind links (lila) Gene aufgeführt, die für Enzyme der Glykolyse codieren und bei niedriger Glukosekonzentration verstärkt exprimiert werden. In hellblau sind die Veränderungen der Gene verdeutlicht, die für Hexose-Transporter mit hoher Affinität codieren. In dunkelblau sind Gene dargestellt, die für die Enzyme der Glukoneogenese codieren.

4.4.2.1 Verstoffwechselung von Glukose zu Fruktose-1,6-Bisphosphat

Nachdem Glukose über die Transporter in die Zelle aufgenommen wurde, erfolgt die Phosphorylierung des Zuckers durch Hexokinase (Hxk) und die Glucokinase (Glk1) (Ahuatzi et al., 2004; Peláez et al., 2012). Bei hoher Glukosekonzentration im Medium wird *HXK2* am stärksten exprimiert, wohingegen *HXK1* erst bei niedriger Glukosekonzentration oder in Abwesenheit des

Zuckers verstärkt abgelesen wird. Hxk2 hat neben der katalytischen auch eine regulatorische Funktion. Die Hexokinase ist zusätzlich an der durch Glukose-vermittelten Repression von Genen beteiligt.

Interessanterweise konnte durch die RNA-Sequenzierung festgestellt werden, dass in den eIF2-Mutanten weniger *HXK2* exprimiert wird. Um zu analysieren, ob die geringere mRNA-Menge in *cdc123-Δ326* und *imt2-4Δ* zu einer Abnahme der Proteinmenge führt, wurden Stämme generiert, in denen *HXK2* mit der Sequenz des HA-Epitop fusioniert waren. Der Western-Blot ergab sowohl im XYGly gewachsenen Wildtyp als auch in den eIF2-Mutanten eine Abnahme der Proteinmenge (n=2, Wildtyp in XYD (100%) in XYGly 0,77%, *cdc123-Δ326* 68% und *imt2-4Δ* 65%, Abbildung 4-25 A-B).

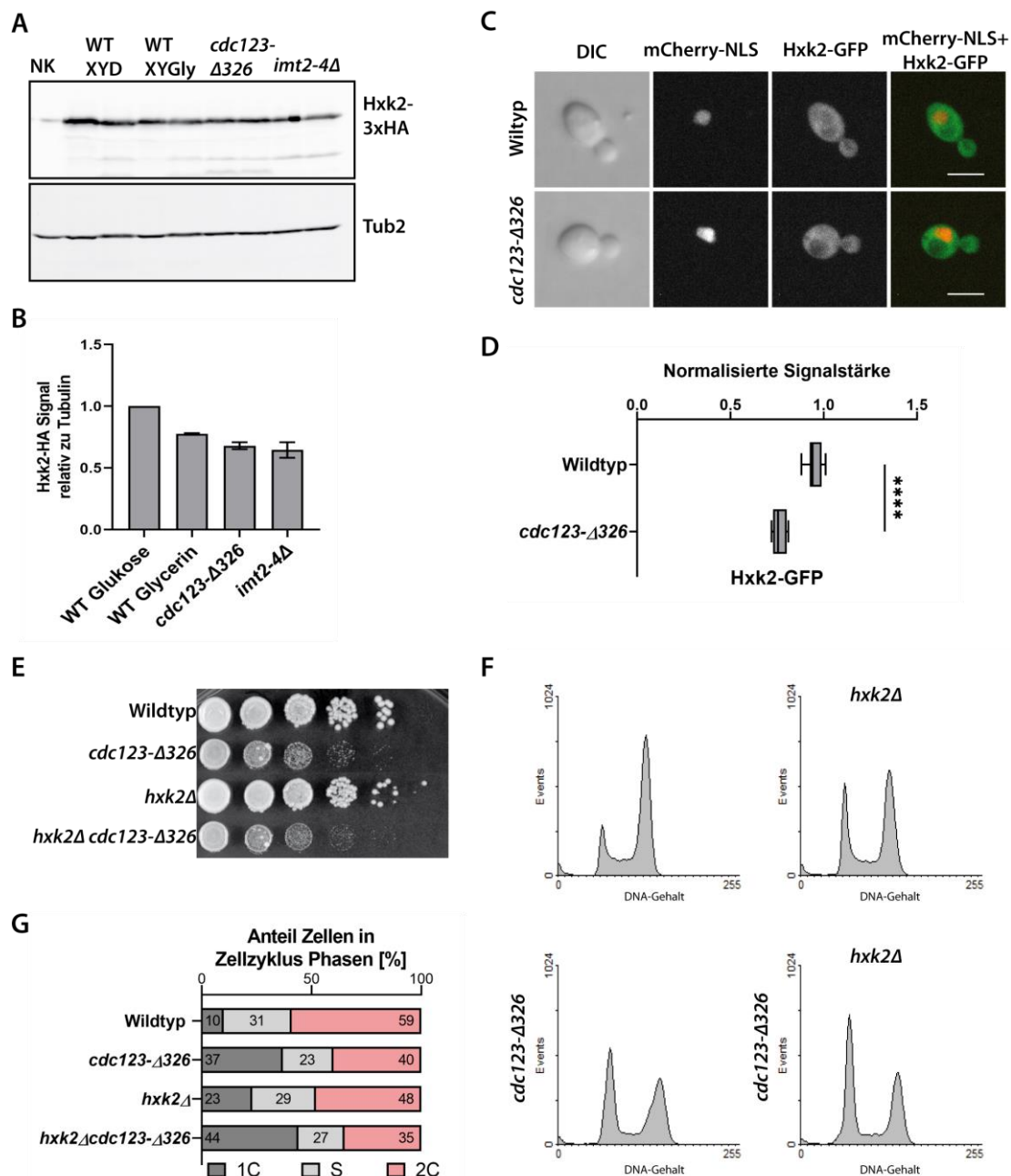


Abbildung 4-25: Hxk2 in eIF2-Mutanten. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

A, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus den folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: K699 (NK), W17194 (*HXK2-3HA*), W17201 (*cdc123-Δ326 HXK2-3HA*) und W17199 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ HXK2-3HA*). Für die Western-Analyse wurden 1 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Hxk2 mit einem HA-spezifischen Antikörper α-HA 12CA5. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen, hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2). **B,** Ist die Quantifizierung des Western-Blots aus A. Die Werte, jeweils zwei pro Genotyp, wurden auf Tubulin bezogen. Normalisiert wurde auf den Wildtyp. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. **C,** Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17189 (*mCherry-NLS HXK2-GFP*) und W17191 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS HXK2-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **D,** Für die Quantifizierung von Hxk2 im Kern wurden je 10 Zellen zufällig ausgewählt. Von der integrierten Dichte, vom *mCherry*- und GFP-Signal jeder Zelle, der Quotient gebildet. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarter t-Test. Signifikanz: **** p<0,0001. **E,** Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W17204 (*hxxk2Δ*) und W17211 (*cdc123-Δ326 hxxk2Δ*) über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **F,** Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus E über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „*Sytox Green*“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **G,** Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Wie schon in der Literatur beschrieben, ist Hxk2 zu 15% im Kern lokalisiert und interagiert mit Mig1 (Ahuatzi et al., 2004; Herrero et al., 1998). Zur Bestimmung der Hxk2-Lokalisation im Wildtyp und auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante wurde das Hxk2 mit GFP markiert. Anhand der Mikroskopiedaten konnte keine deutliche Kernlokalisierung in den Stämmen festgestellt werden. Nach Quantifizierung und Normalisierung auf das jeweilige rote Kernsignal (*mCherry-NLS*) war ein deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen *cdc123-Δ326* und Wildtyp sichtbar (n=10 Zellen im Wildtyp Mittelwert 0,95 und in *cdc123-Δ326* Mittelwert 0,76, Abbildung 4-25 C-D). Eine geringere Lokalisation von Hxk2 im Kern könnte, ähnlich wie bei Mig1 (vgl. 4.4.1), zur einer Derepression der Glukose-reprimierten Gene führen. Da allerdings auch weniger Gesamtprotein in den eIF2-Mutanten detektiert wurde, könnte dies der Grund für die reduzierte Kernlokalisierung von Hxk2 sein.

In den eIF2-Mutanten konnte weniger Hxk2 detektiert werden. Daraus ergab sich die Frage, ob eine Deletion von *HXK2* Auswirkungen auf das Wachstum und auf den Zellzyklus hat. Im Wachstum konnte ein geringfügiger Effekt zwischen Wildtyp und der *hxxk2Δ*-Mutante festgestellt werden. Auch die Doppelmutante (*cdc123-Δ326 hxxk2Δ*) wuchs geringfügig langsamer als die *cdc123-Δ326*-Mutante (Abbildung 4-25 E). Die Untersuchung des Zellzyklus ergab, dass die *hxxk2Δ*-Zellen deutlich mehr 1C im Vergleich zum Wildtyp hatten. In der Doppelmutante *cdc123-Δ326 hxxk2Δ* konnte ebenfalls geringe Effekt detektiert werden (1C im Wildtyp 10% *hxxk2Δ* 1C 23%, in *cdc123-Δ326* 1C 37% und in *cdc123-Δ326 hxxk2Δ* 1C 44%, Abbildung 4-25 F-G).

Durch den Verlust der Hexokinase konnte eine Verzögerung des Zellzyklus beobachtet werden. In der *eIF2*-Mutante wurde durch die zusätzliche Deletion von *HXK2* ein additiver Effekt festgestellt. Die G1-Verzögerung in der *cdc123-Δ326*-Mutante kann somit nicht nur durch die verringerte Hxk2-Menge erklärt werden.

Nach der Aufnahme und der Phosphorylierung von Glukose wird durch die Trehalose-6-Phosphat-Synthase (*Tps1*) Trehalose-6-Phosphat gebildet. In weiteren Schritten wird Trehalose produziert. Trehalose ist ein stabiler Speicherstoff, dem unterschiedliche Rollen in der Zelle zugeschrieben werden (Gibney et al., 2015). Die Deletion von *TPS1* führt zu einem Wachstumsdefekt, wenn fermentierbare Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen. Des Weiteren kann eine Akkumulation von Nebenprodukten der Glykolyse, eine Reduktion von frei verfügbarem Phosphat und eine damit verbundene starke ATP-Abnahme detektiert werden. Das ATP wird jedoch für die Synthese von Fruktose-1,6-Bisphosphat benötigt (Aelst et al., 1993; Thevelein & Hohmann, 1995). Durch den Nebenzweig, in dem ein Teil der Glukose gespeichert wird, erfolgt eine Reduktion des glykolytischen Flusses (Blázquez et al., 1993). Der Weg dient als eine Art Sicherheitsventil der Glykolyse (Blomberg, 2000; Smallbone et al., 2011). Diese Verminderung des Flusses ist für die Energiegewinnung und für das Wachstum mit Glukose notwendig. Eine Deletion von *HXK2* kann das Wachstum in *tps1Δ*-Mutanten auf Glukose wiederherstellen (Hohmann et al., 1993).

Die bisher erhobenen Daten deuten auf einen veränderten glykolytischen Fluss hin (Abbildung 4-25). Zudem wurde eine verminderte Menge von Hxk2 in den *eIF2*-Mutanten detektiert. Da *tps1Δ*-Mutanten bei ausreichender Menge von Hxk2 nicht auf Glukose wachsen können, stellte sich die Frage, ob die Doppelmutante *cdc123-Δ326 tps1Δ* mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Wachstumsunterschiede aufweist. Zu diesem Zweck wurden ein Wachstumstest sowie die Analyse des DNA-Gehaltes in unterschiedlichen Mutanten durchgeführt (Abbildung 4-26). Für die Analyse wurde neben der Deletion von *HXK2* auch das Gen, welches für Phosphofruktokinase 2 (*PFK2*) codiert, deletiert. Das Enzym katalysiert einen späteren Schritt in der Glykolyse (vgl. Abbildung 4-24 A) und liegt somit hinter dem Trehalose-Nebenzweig.

Die *tps1Δ*-Mutante wuchs, wie schon in der Literatur beschrieben, nicht auf Glukose. Auf Raffinose (R) und auf Glycerin konnte ein Wachstum dieser Mutante festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der *tps1Δ*-Mutante auf Glukose durch die *cdc123-Δ326*-Mutante teilweise wiederhergestellt (Abbildung 4-26 A). Auf allen drei Platten (XYD, -R, -Gly) wuchs die Doppelmutante *cdc123-Δ326 tps1Δ* schlechter als die *cdc123-Δ326*-Mutante. Wohingegen sich die *tps1Δ*-Zellen auf der XYGly-Platte nicht vom Wildtyp unterschied. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Wachstum der Doppelmutanten *tps1Δ hxxk2Δ* und *tps1Δ pfk2* betrachtet. Die verwendeten Platten lieferten kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *tps1Δ hxxk2Δ*-Mutante. Dies bestätigt die zuvor beschriebenen Daten aus der Literatur (Hohmann et al., 1993). Die Doppeldeletion von *TPS1* und *PFK2* hatte einen ähnlichen Effekt wie *tps1Δ*. Sie

wuchs nicht auf Medium mit Glukose (Abbildung 4-26 A). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Enzym erst nach dem Trehalose-Nebenzweig eine Rolle spielt.

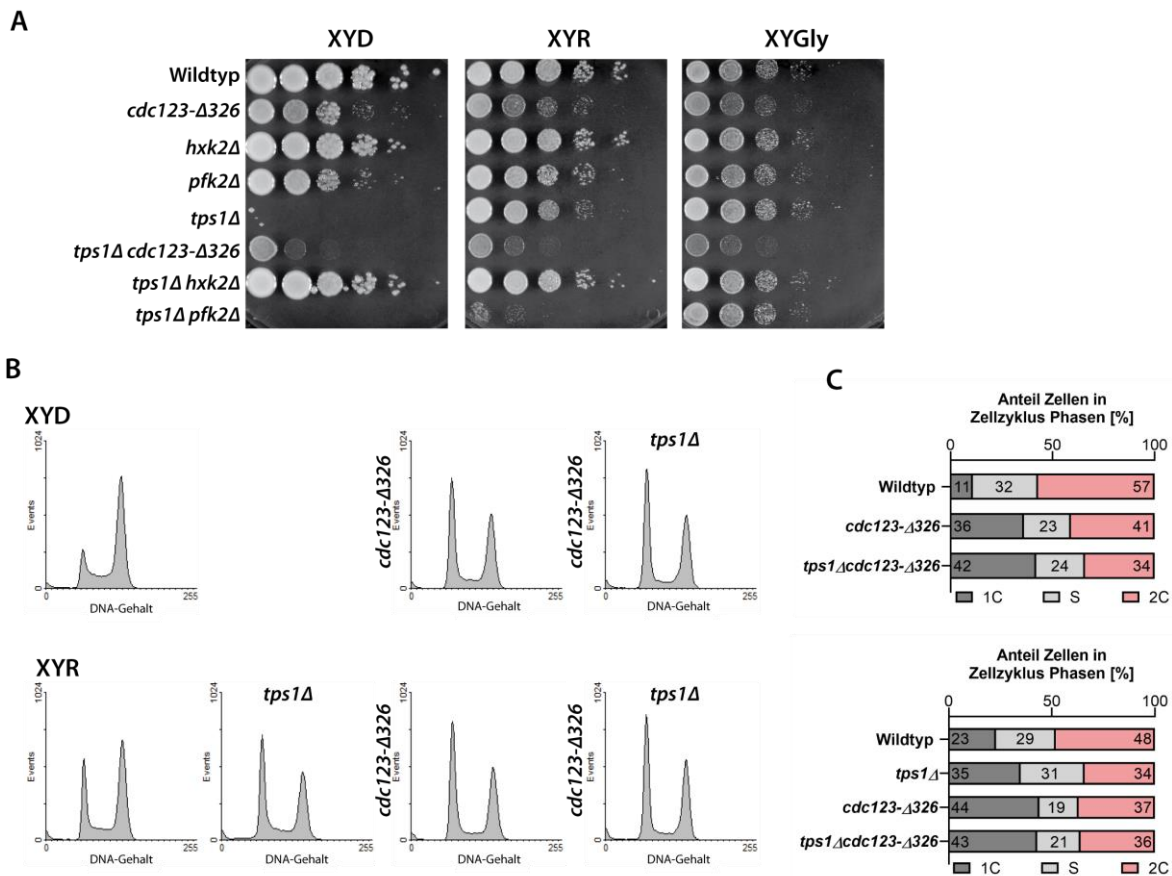


Abbildung 4-26: Wachstum auf XYD von *cdc123-Δ326 tps1Δ*. **A**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W17204 (*hxxk2Δ*), W17835 (*pfk2Δ*), W17808 (*tps1Δ*) W17810 (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) W18120 (*hxxk2Δ tps1Δ*) und W18033 (*pfk2Δ tps1Δ*) über Nacht bei 30°C in XYR angezogen und am nächsten Tag mit Wasser gewaschen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe, erstellt wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf je eine XYD, XYR- und XYGly-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **B**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W17808 (*tps1Δ*) und W17810 (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) über Nacht bei 25°C in XYD und XYR kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **C**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Für die Zellzyklus-Analysen wurden die Zellen in XYD und -R angezogen. In XYD konnte *tps1Δ* nicht wachsen. Die Doppelmutante (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) zeigte in XYD eine leichte Verschiebung des Zellzyklus im Vergleich zur *cdc123-Δ326*-Mutante (in XYD 1C-Zellen in *cdc123-Δ326* 36% und in *cdc123-Δ326 tps1Δ* 42%, Abbildung 4-26 B-C). Ähnlich viele Zellen hatten einen einfachen DNA-Gehalt, wenn die Cdc123 Verkürzung mit der HXXK2-Deletion kombiniert wurde (vgl. Abbildung 4-25). Bei der Betrachtung von *tps1Δ* in XYR war erkennbar, dass diese Mutante mehr 1C-Zellen als der Wildtyp besaß. Der Anteil war aber trotzdem noch geringer als in der *cdc123-Δ326*-Mutante oder der in der Doppelmutante (in XYR 1C-Zellen im Wildtyp 23%, in *tps1Δ* 35%, in *cdc123-Δ326* 44% und in *cdc123-Δ326 tps1Δ* 43%, Abbildung

4-26 B-C). Außerdem war auffällig, dass die Doppelmutante (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) mit beiden Kohlenstoffquellen eine sehr ähnliche Verteilung des Zellzyklus hervorbrachte. Bei dieser Mutante machte es demnach keinen Unterschied, welche Kohlenstoffquelle den Zellen zur Verfügung stand. Dies könnte daran liegen, dass in beiden Bedingungen der glykolytische Fluss verringert ablief. In der eIF2-Mutante wäre es möglich, dass noch eine Hxk2-Aktivität vorhanden ist. Diese jedoch im Vergleich zur wildtypischen Situation reduziert vorliegt, da weniger Protein in der eIF2-Mutante exprimiert wird. Dies könnte zu einem verminderten glykolytischen Fluss in der *cdc123-Δ326*-Mutante führen und das Wachstum der Doppelmutante (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) auf Glukose erklären. In Raffinose läuft ebenfalls die Glykolyse ab. Das Trisaccharid muss zuvor mithilfe der Invertase in seine einzelnen Zuckerbestandteile Glukose, Fruktose und Galaktose gepalten werden (Snitkin et al., 2008). Es scheint so, dass durch Raffinose oder durch die *HXK2*-Deletion der glykolytische Fluss verlangsamt wird, wodurch die *tps1Δ*-Mutante wieder lebensfähig ist. Die Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass der glykolytische Fluss in den eIF2-Mutanten verlangsamt abläuft und das bereits im ersten Schritt der Glykolyse.

Die Hexokinase und die Trehalose-6-Phosphat-Synthase haben Einfluss auf den glykolytischen Fluss. Durch Deletion der Enzym-codierenden Gene wird das Wachstum auf Glukose (in *tps1Δ*) und die Verteilung der Zellen im Zellzyklus beeinflusst. Ein weiterer wichtiger Schritt und ein Kontrollpunkt in der Glykolyse ist die Katalyse von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat durch die Phosphofruktokinasen 1 und 2 (Pfk1/2). Dieser Schritt in der Glykolyse ist irreversibel. Die Kinase kann allosterisch modifiziert werden, wobei Pfk1 und Pfk2 wichtige regulatorische Enzyme des Stoffwechselwegs sind (Tripodi et al., 2015). Da die vorangeschalteten Enzyme schon Effekte auf den Zellzyklus und auf *cdc123-Δ326* hatten, wurden auch die Pfk1/2 näher untersucht.

Die Deletion von *PFK2* bewirkt ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und zur *hxxk2Δ*-Mutante (Abbildung 4-27 A). Die Doppeldeletion (*cdc123-Δ326 pfk2Δ*) führt zu einem noch größeren Wachstumsdefekt als in der *cdc123-Δ326*-Mutante. Bei dem Vergleich mit der Einzelmутante (*pfk2Δ*) wird kein Unterschied zur Doppelmutante (*pfk2Δ hxxk2Δ*) ersichtlich, wohingegen *cdc123-Δ326 pfk2Δ hxxk2Δ* besser zu wachsen scheint als *cdc123-Δ326 pfk2Δ* (Abbildung 4-27 A). Die Zellzyklus-Analysen ergaben, dass die jeweiligen Einzelmутanten mehr 1C-Zellen im Vergleich zum Wildtyp hatten (1C-Zellen im Wildtyp 9%, in *pfk1Δ* 17% und *pfk2Δ* 40%, Abbildung 4-27 B-C). Bei der Betrachtung der *pfk2Δ hxxk2Δ*-Mutanten konnte kein stärkerer Unterschied in der Zellzyklus-Verteilung im Vergleich zur Einzelmутante *pfk2Δ* festgestellt werden (1C-Zellen in *pfk2Δ* 40% und in *pfk2Δ hxxk2Δ* 38%, Abbildung 4-27 B-C). Der Effekt, der aus der Deletion von *PFK2* hervorgeht, wird nicht durch den zuvor beschriebenen Effekt der *HXK2*-Deletion (vgl. Abbildung 4-25) verstärkt. Der in der Doppelmutante *pfk2Δ hxxk2Δ* auftretende Zellzyklus-Effekt ist somit nicht additiv. Zudem wurden die beschriebenen Deletionen noch mit der *cdc123-Δ326*-Mutante kombiniert. Hier konnte in den *cdc123-Δ326 pfk1Δ*-Zellen eine ähnliche Verteilung der 1C-Zellen im Vergleich zur Einfachmutanten (in

cdc123-Δ326) gefunden werden. (Wildtyp 1C-Zellen 9%, *pfk1Δ* 17%, *cdc123-Δ326* 35% und *cdc123-Δ326 pfk1Δ* 39%, Abbildung 4-27 B-C). Dies, obwohl in *pfk1Δ* mehr 1C-Zellen als im Wildtyp vorlagen. Wie zuvor im Wachstumstest gezeigt, hat die Doppelmutante (*cdc123-Δ326 pfk2Δ*) auch in der Zellzyklus-Analyse den stärksten Effekt, da prozentual am meisten 1C-Zellen detektiert wurden (*cdc123-Δ326 pfk2Δ* 54%). Interessanterweise konnte dieser Effekt durch die Deletion von *HXK2* wieder rückgängig gemacht werden (1C-Zellen in *cdc123-Δ326 pfk2Δ hxxk2Δ* 38%). Zwischen der Doppelmutante (*pfk2Δ hxxk2Δ*) und der Dreifachmutante (*cdc123-Δ326 pfk2Δ hxxk2Δ*) war in der Menge an 1C-Zellen kein Unterschied zu sehen (*pfk2Δ hxxk2Δ* und *cdc123-Δ326 pfk2Δ hxxk2Δ* 1C 38%, Abbildung 4-27 B-C). Festzuhalten ist, dass die Deletion von *PFK2* eine starke Zellzyklus-Verschiebung Richtung G1 nach sich zieht, welche durch die *cdc123-Δ326*-Mutante verstärkt wird. Erfolgt die Störung der Glykolyse in einem früheren Schritt, (*hxxk2Δ*) treten die Zellen wieder schneller in den Zellzyklus ein. Die Deletionen der beiden glykolytischen Enzyme *HXK2* und *PFK2*, führt zu einer veränderten Zellzyklus-Verteilung. Die verminderte Menge dieser Proteine in eIF2-Mutanten könnten für den verspäteten Zellzykluseintritt mitverantwortlich sein.

In der Literatur wurde beschrieben, dass Pfk2 in der exponentiellen Wachstumsphase, wenn Glukose vorhanden ist, verteilt im Cytoplasma vorliegt. Beim Wachstum der Zellen ohne Sauerstoff, wenn die Glykolyse hochreguliert ist, bildet Pfk2 glykolytische Körper (Jin et al., 2017). Da eine Deletion von *PFK2* zu einer veränderten Zellzyklus-Verteilung führt, bot es sich an, die Lokalisation von Pfk1 und 2 für ein besseres Verständnis näher zu untersuchen. Im Wildtyp und auch in der Mutante wurde ein cytoplasmatisches Signal in exponentiell wachsenden Zellen detektiert (Abbildung 4-27 D). Die Untersuchung von Pfk1 und 2 ergab im Wildtyp und auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante keinen Unterschied. In Zellen, die mit Sauerstoff und Zucker exponentiell wachsend waren, lagen beide Enzyme in beiden Genotypen verteilt im Cytoplasma vor (Abbildung 4-27 D oben). Bei Betrachtung des Wildtyps nach dem diauxischen Wechsel (48h Wachstum im Schüttler bei 25°C) oder in der stationären Phase (144h Wachstum im Schüttler bei 25°C) konnten deutliche Pfk2-GFP Aggregate detektiert werden (n=100 Zellen mit Aggregate nach 48h 28% und nach 144h 63%, Daten nicht gezeigt). In Pfk1 waren diese Aggregate nicht zu sehen. Das Enzym lag auch hier verteilt im Cytoplasma vor (Abbildung 4-27 D unten). Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und eIF2-Mutanten in der Lokalisation von Pfk1 und 2 gefunden werden. Trotz hoher glykolytischer Aktivität waren keine glykolytischen Körper im Wildtyp zu sehen. In der Literatur wurde dies auch erst unter Hypoxie-Bedingungen detektiert (Jin et al., 2017). Der glykolytische Fluss ist vermutlich im Wildtyp unter aeroben Bedingungen zu gering, weshalb das Signal von Pfk1 bzw. Pfk2 verteilt im Cytoplasma vorlag.

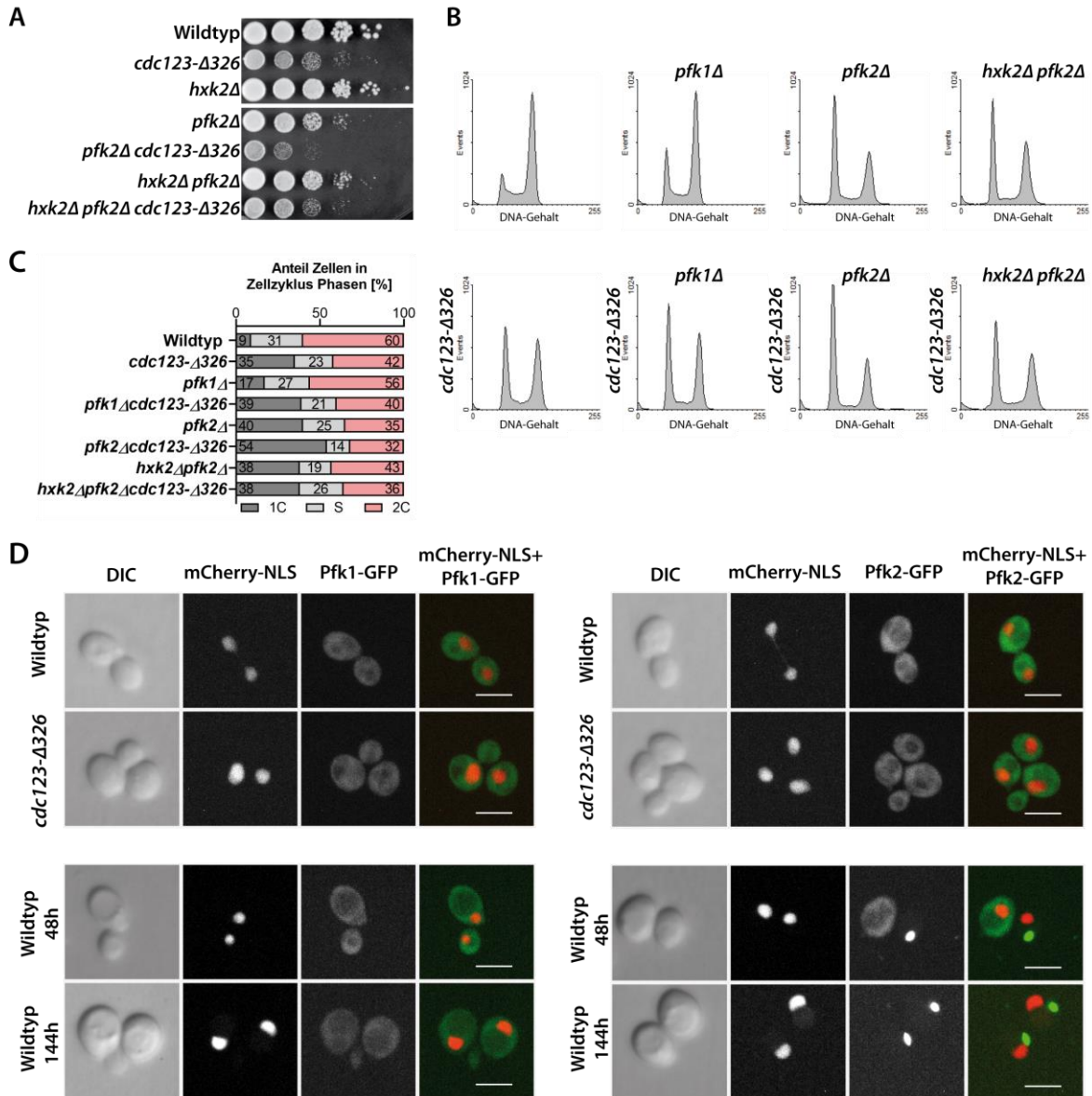


Abbildung 4-27: Phosphofruktokinase in *cdc123-Δ326*. **A**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp) W15596 (*cdc123-Δ326*), W17204 (*hxxk2Δ*), W17835 (*pfk2Δ*), W17837 (*cdc123-Δ326 pfk2Δ*), W17902 (*hxxk2Δ pfk2Δ*) und W17904 (*cdc123-Δ326 hxxk2Δ pfk2Δ*) über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine YEA-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **B**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus A (außer W17202) und W17829 (*pfk1Δ*) und W17831 (*cdc123-Δ326 hxxk2Δ pfk1Δ*) über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **C**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurde. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase). **D**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17733 (*mCherry NLS PFK1-GFP*), W17734 (*cdc123-Δ326 mCherry NLS PFK1-GFP*), W17736 (*mCherry NLS PFK2-GFP*) und W17737 (*cdc123-Δ326 mCherry NLS PFK2-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert (oben). Außerdem wurden W17733 und W17736 bei 25°C für 48h bzw. 144h geschüttelt und auf einem Deckgläschen unter Wasser Agar für die Mikroskopie präpariert (unten). Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

Durch die Untersuchung der Glykolyse konnten einige Faktoren gefunden werden, die sich in der *cdc123-Δ326*-Mutante und im Wildtyp unterschieden. Die RNA-Seq-Daten zeigten eine verringerte mRNA-Menge der Gene, die für die glykolytischen Enzyme codieren (vgl. Abbildung 4-24). In der eIF2-Mutante wäre demnach ein verminderter glykolytischer Fluss denkbar. Weitere Faktoren, die in den Mutanten für einen reduzierten glykolytischen Fluss sprechen, ist die verminderte Hxk2-Proteinmenge (vgl. Abbildung 4-25). Zudem wuchs die *cdc123-Δ326 tps1Δ*-im Gegensatz zu *tps1Δ*-Mutante mit Glukose (vgl. Abbildung 4-26). Das könnte an der geringeren Hxk2-Menge liegen, da auch die *tps1Δ hxxk2Δ*-Mutante wieder in Gegenwart von Glukose wachsen kann. Neben der Deletion von *hxxk2Δ* zeigte auch *pfk2Δ* eine Zellzyklus-Verschiebung Richtung 1C-Zellen (vgl. Abbildung 4-27). Der Effekt wurde durch die *CDC123*-Mutation verstärkt. Dieser additive Effekt deutet darauf hin, dass eine verminderte Expression dieser Gene nicht die alleinige Ursache des verspäteten Zellzykluseintritts ist. Eine weitere Deletion von *hxxk2Δ* in der *cdc123-Δ326 pfk2Δ*-Mutante führte wieder zu weniger 1C-Zellen. Der glykolytische Fluss könnte aufgrund der verminderten Hxk2-Menge in *cdc123-Δ326* ein wichtiger Faktor für den verspäteten Eintritt sein.

4.4.2.2 Proteinkinase A-Aktivität in *cdc123-Δ326*

Ein wichtiger Stoffwechselweg, der ebenfalls durch Glukose gesteuert wird, ist der Ras-cAMP-PKA Weg (Broach, 2012; Busti et al., 2010). Hierbei wird die PKA durch das GTP-gebundene Ras, gefolgt von der cAMP Bildung, aktiviert. Die aktive PKA ist an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Sie aktiviert unter anderem die Zellproliferation durch die Phosphorylierung von Whi3 (Mizunuma et al., 2013). Whi3 inhibiert die Funktion des Cyclins Cln3, indem es an die *CLN3*-mRNA bindet. Die Phosphorylierung von Whi3 führt zur Inaktivierung des Proteins und gleichzeitig zum Fortschreiten der G1- in die S-Phase. An der Aktivierung von Ras ist Fruktose-1,6-Bisphosphat maßgeblich beteiligt, indem es Cdc25, der GEF von Ras, aktiviert (Peeters et al., 2017). Durch das GTP-gebundene Ras wird die Adenylatcyclase (Cry1) aktiviert und cAMP gebildet. Das gebildete cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit (Bcy1) von PKA, die danach von den katalytischen Untereinheiten (Tpk1-3) dissoziiert (Abbildung 4-28A).

In den *cdc123-Δ326*-Mutanten wurde festgestellt, dass Hxk2 in reduzierte Menge vorliegt, was zu einer Verringerung des glykolytischen Flusses führen könnte (vgl. Abbildung 4-25). Eine mögliche Auswirkung des verminderten Flusses ist die geringere Ausbeute von Fruktose-1,6-Bisphosphat, gefolgt von weniger aktiven Ras und somit auch weniger aktiver PKA. Um zu untersuchen ob Ras einen Einfluss auf das Wachstum und den Zellzyklus hat, wurden Stämme hergestellt, die entweder eine Deletion in *RAS2* oder ein dauerhaft aktives Ras2 besaßen. Die Herstellung des konstitutiv aktiven Ras2 erfolgte durch eine gerichtete Mutagenese, wobei das Glycin an Position 19 durch ein Valin ersetzt wurde (Gimeno et al., 1992; Kataoka et al., 1984; Toda et al., 1985). Der Wildtypstamm wurde daraufhin entweder mit dem dauerhaft aktiven *RAS2*- oder dem wildtypischen *RAS2*-Konstrukt transformiert. So konnte sichergestellt werden, dass der Auslöser für die betrachteten Effekte nicht die zusätzliche *RAS2*-Gendosis war.

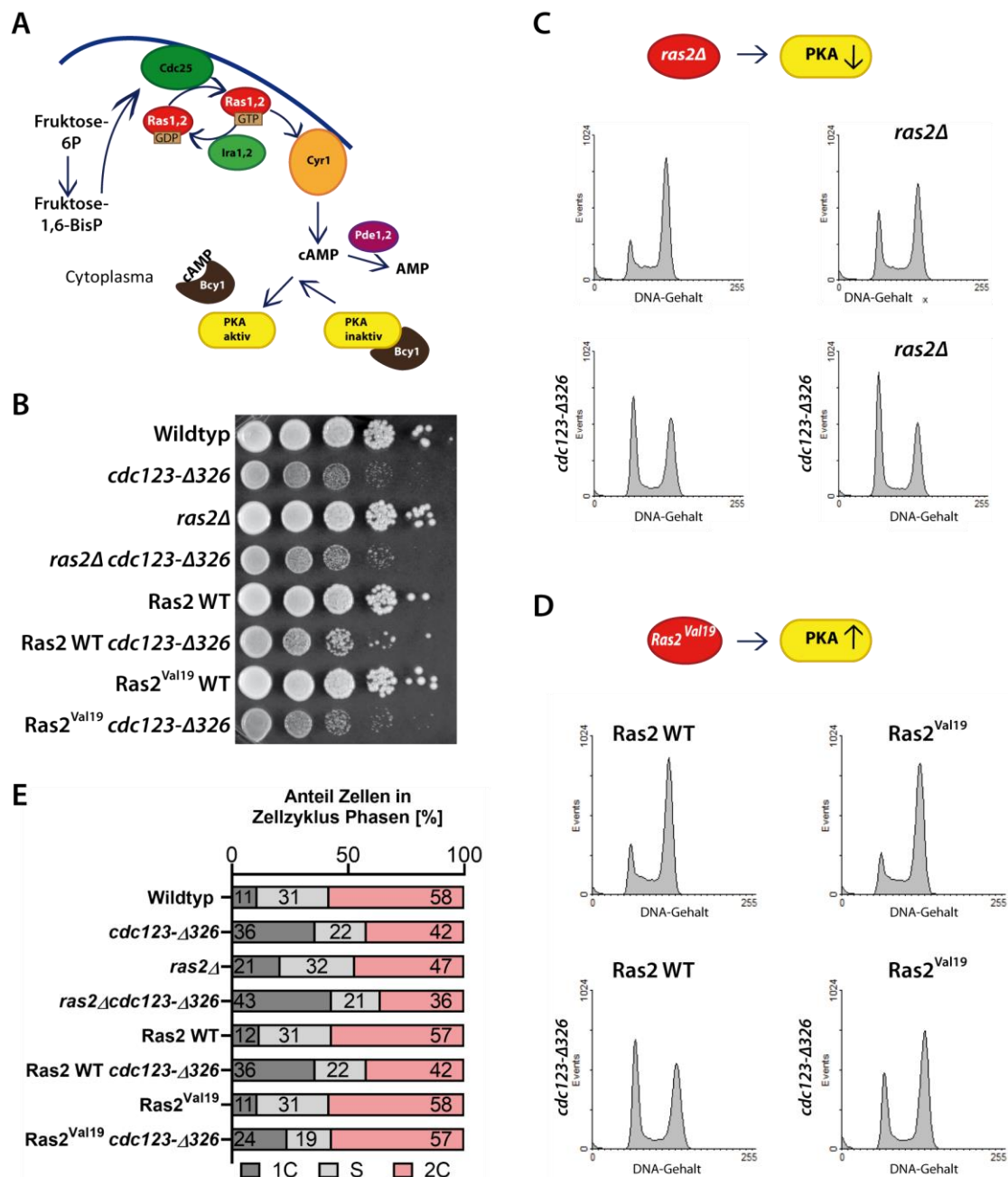


Abbildung 4-28: Dauerhaft aktives Ras führt zu weniger 1C-Zellen in *cdc123-Δ326*. **A**, Schematische Darstellung des PKA-Signalweges. Hierbei führt Fructose-1,6-Bisphosphat zu einer Aktivierung von Cdc25 dem GEF Faktor von Ras. Durch den Austausch von GDP zu GTP wird Ras aktiv. Adenylatcyclase (Cyr1) wird daraufhin aktiviert und bildet cAMP, welches einerseits von den Phosphodiesterasen (Pde1/2) abgebaut werden kann und andererseits an die regulatorische Untereinheit (Bcy1) von PKA bindet. Durch die Bindung dissoziiert Bcy1 von den katalytischen Untereinheiten der PKA (Tpk1-3), was zu einer Aktivierung des Enzyms führt. **B**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W16630 (*ras2Δ*), W16649 (*cdc123-Δ326 ras2Δ*), W17580 (*pRAS2-RAS2-tRAS2*), W17584 (*cdc123-Δ326 pRAS2-RAS2-tRAS2*), W17589 (*pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2*) und W17593 (*cdc123-Δ326 pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2*) über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **C-D**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus B über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **E**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurde. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Von den transformierten Hefestämmen wurde die DNA isoliert und mithilfe der qPCR die Integrationshäufigkeit überprüft. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass Stämme für die Untersuchung ausgewählt wurden, in denen die gleiche Gendosis beider *RAS2*-Varianten vorlag. Die neu hergestellten Stämme wurden zunächst im Wachstumstest näher untersucht. Die Deletion von *RAS2* und das dauerhaft aktive Ras2 (Ras^{val19}) hatten ein unverändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4-28 B). Bei der Betrachtung der *cdc123-Δ326*-Mutante, in Kombination mit den *RAS2* Mutanten, konnten ebenfalls kein Unterschied zur Einfachmutante (*cdc123-Δ326*) festgestellt werden. Das konstitutiv aktive Ras2 beschleunigte somit nicht das Wachstum der eIF2-Mutante.

Bei der Verteilung der Zellen im Zellzyklus war ersichtlich, dass die Deletion von *RAS2* zu mehr 1C-Zellen im Vergleich zum Wildtyp führte (1C-Zellen Wildtyp 11% und *ras2Δ* 21%, Abbildung 4-28 C,E). Dieser Effekt wurde durch *cdc123-Δ326* verstärkt (1C-Zellen *cdc123-Δ326* 36% und *cdc123-Δ326 ras2Δ* 43%, Abbildung 4-28 C,E). Dies deutet darauf hin, dass Ras2 für eine wildtypische Zellzyklus-Progression nötig ist. Die Betrachtung des konstitutiv aktiven Ras^{val19} ergab in der *cdc123-Δ326*-Mutante deutlich weniger 1C-Zellen im Vergleich zur Einfachmutante (*cdc123-Δ326*), wohingegen das wildtypische Ras2-Konstrukt keinen Einfluss auf den Zellzyklus der Mutante hatte (1C-Zellen *cdc123-Δ326* 36% sowie *cdc123-Δ326 Ras2* 36%, *cdc123-Δ326 Ras^{val19}* 24%, Abbildung 4-28 D-E). Das dauerhaft aktive Ras2 zeigte im Wildtyp keinen Unterschied in der Menge an Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (1C-Zellen Wildtyp und Ras^{val19} 11%). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch das konstitutive aktive Ras2 der Eintritt in den Zellzyklus in *cdc123-Δ326* teilweise wiederhergestellt werden kann. Es wäre somit möglich, dass in den eIF2-Mutanten eine verringerte Aktivierung von Ras2 vorliegt. Dies könnte am verminderten glykolytischen Fluss liegen.

Wie schon erwähnt, wird durch das GTP-gebundene Ras die Adenylatcyclase aktiviert. Das durch die Adenylatcyclase gebildete cAMP wird nicht nur von der regulatorischen PKA-Untereinheit gebunden, sondern zusätzlich durch die Phosphodiesterasen (Pde1/2) reguliert (Broach, 2012). Die Phosphodiesterase mit niedriger Affinität wird von *PDE1* und die mit hoher Affinität von *PDE2* codiert. Pde2 spielt eine wichtigere Rolle in der Regulation der PKA-Aktivität (Abbildung 4-28 A). Zusätzlich wurde beschrieben, dass eine erhöhte *PDE2*-Menge den Phänotyp von Ras^{val19} unterbinden kann (Sass et al., 1986). Da Pde2 ebenfalls einen Einfluss auf die PKA-Aktivität ausübt, stellte sich die Frage, ob eine Deletion von *PDE2* zu einem veränderten Zellzykluseintritt in der *cdc123-Δ326*-Mutante führt.

Für die Beantwortung der Frage wurde zunächst das Wachstum untersucht. Durch die Deletion von *PDE2* konnte, wie schon zuvor auch das dauerhaft aktive Ras2, das Wachstum der eIF2-Mutante nicht verbessert werden (Abbildung 4-29 A). Die Überexpression von *PDE2* führte im Wildtyp jedoch zu einem etwas langsameren Wachstum. In der eIF2-Mutante war nach der Überexpression kein Unterschied sichtbar (Abbildung 4-29 A).

Neben dem Wachstumstest wurde der Zellzyklus in den *PDE2*-Mutanten näher untersucht. Durch die Deletion von *PDE2* entstand der Eindruck, dass weniger 1C-Zellen als im Wildtyp vorhanden waren (1C-Zellen Wildtyp 13%, *pde2Δ* 10%, Abbildung 4-29 B-C). In der Kombination mit der *cdc123-Δ326*-Mutante konnte jedoch kein Unterschied zur Einfachmutante (*cdc123-Δ326*) festgestellt werden (1C-Zellen *cdc123-Δ326* 38% und *cdc123-Δ326 pde2Δ* 40%, Abbildung 4-29 B-C). Die verstärkte *PDE2*-Expression führte sowohl mit als auch ohne *cdc123-Δ326* zu einem Anstieg von 1C-Zellen (*pTEF2-PDE2* 43% und *cdc123-Δ326 pTEF2-PDE2* 51%, Abbildung 4-29 B-C). Wobei der Effekt ohne *eIF2*-Mutation deutlich stärker war (in *pTEF2-PDE2* 30% mehr 1C-Zellen als im Wildtyp und in *cdc123-Δ326 pTEF2-PDE2* 13% mehr als in *cdc123-Δ326*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion von *PDE2* nicht zu einer starken Erhöhung der PKA-Aktivität beiträgt. Wohingegen eine verstärkte *PDE2*-Expression zu einer erhöhten Menge an 1C-Zellen und vermutlich zu einer verminderten PKA-Aktivität führt. Der *PDE2*-Überexpressions-Effekt ist in der *cdc123-Δ326*-Mutante nicht additiv. Es wäre denkbar, dass in der *eIF2*-Mutante der glykolytische Fluss inhibiert ist. Die daraus resultierte Abnahme von Fruktose-1,6-Bisphosphat führt zu weniger GTP-gebundenen Ras2. Die vermutlich reduzierte Menge an aktiven Ras2 führt dementsprechend zu weniger produzierten cAMP und folglich zu einer Abnahme der PKA-Aktivität. Dies würde bedeuten, dass eine Überexpression von *PDE2* einen geringen Effekt in der *eIF2*-Mutante hat, da hier schon zu wenig cAMP gebildet wurde.

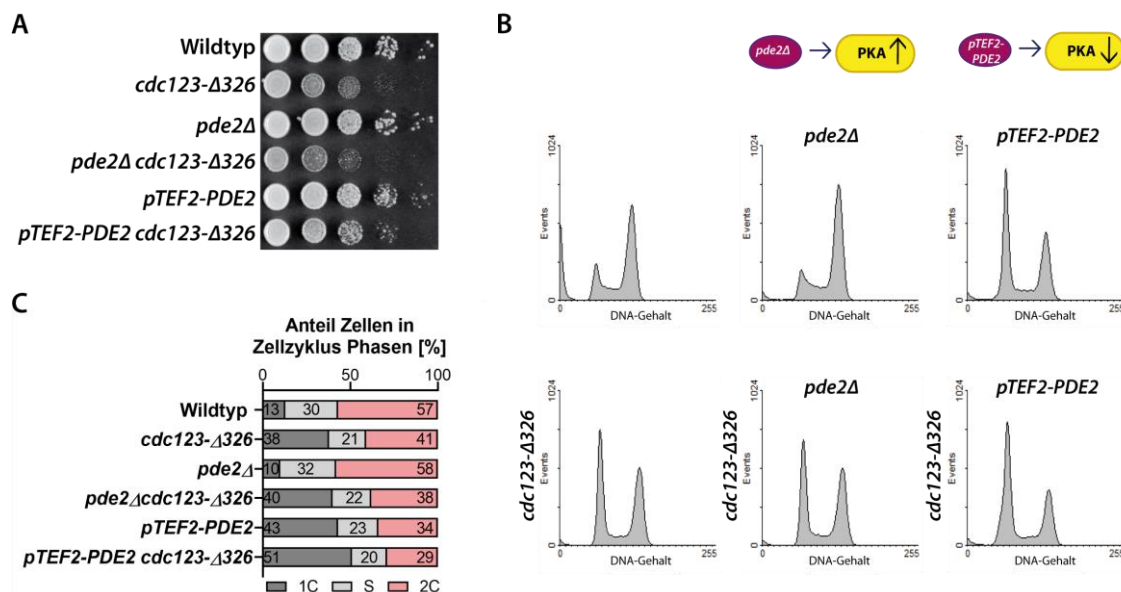


Abbildung 4-29: Überexpression von *PDE2* verändert Zellzyklus-Verteilung. Verwendete Stämme: K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W16547 (*pde2Δ*), W16624 (*cdc123-Δ326 pde2Δ*), W16542 (*pTEF2-FLAG-PDE2*) und W16620 (*cdc123-Δ326 pTEF2-FLAG-PDE2*). **A**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme über Nacht bei 30°C angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **B**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **C**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

Die zuvor erhobenen Daten zeigen, dass die Veränderungen von *RAS2* und *PDE2* eine Zellzyklus-Verschiebung Richtung 1C-Zellen nach sich ziehen. Das dauerhaft aktive Ras2 führt in der eIF2-Mutante zu einem verbesserten Zellzykluseintritt. Dies könnten an einer erhöhten PKA-Aktivität liegen. Um zu überprüfen, ob die PKA-Aktivität in der *cdc123-Δ326*-Mutante verändert vorliegt, wurde Cki1, ein Substrat der Kinase, in der Western-Analyse untersucht. Hierbei wurde ein Reporter mit einer HA3 markierten Cki1-Variante (AS 2-200) hergestellt. Diese Variante wird von PKA phosphoryliert (García et al., 2017). In der Western-Analyse ist die Mobilität von Cki1 durch die Phosphorylierung verlangsamt. Neben der eIF2-Mutante wurden weitere Mutanten, bei denen eine veränderte PKA-Aktivität vermutet wird, untersucht (Mutanten aus Abbildung 4-28, Abbildung 4-29). Proteinextrakte der neu hergestellten Stämme wurden über die Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Nachweis von Cki1P (phosphoryliert) bzw. Cki1 kam ein HA-Epitop-spezifischer Antikörper zum Einsatz. Für die Quantifizierung wurde ein Quotient aus der Menge von Cki1P (obere Bande) und der Gesamtmenge (beide Banden) gebildet und auf den in Glukose gewachsenen Wildtyp normiert (Abbildung 4-30). Als Kontrolle wurden Wildtypzellen in XYGly angezogen. Hier konnten weniger Cki1 in der phosphorylierten Form detektiert werden im Vergleich zum Wildtyp, der in XYD gewachsenen ist (Quotient Cki1P/Cki1 log2 Werte normalisiert auf Wildtyp XYD (0), Wildtyp XYGly -0,73, Abbildung 4-30). In der eIF2-Mutante lag ebenfalls weniger der Cki1P vor (*cdc123-Δ326* -0,26, Abbildung 4-30). In den Stämmen (Wildtyp und *cdc123-Δ326*), in denen das wildtypische Ras2 Konstrukt integriert wurde, konnte kein Unterschied zum in XYD gewachsenen Wildtyp bzw. zur eIF2-Mutante festgestellt werden (Quotient Cki1P/Cki1 log2-Werte normalisiert auf Wildtyp XYD, Ras2-WT -0,09 und *cdc123-Δ326* Ras2-WT -0,3, Abbildung 4-30). Eine deutlich stärkere PKA-Aktivität war durch das konstitutiv aktive Ras^{val19}, sowohl im Wildtyp als auch in Kombination mit *cdc123-Δ326* ersichtlich. Hier konnte sogar kein Unterschied des Phosphorylierungsstatus von Cki1 zwischen Ras^{val19} und *cdc123-Δ326* Ras^{val19} gefunden werden (Quotient Cki1P/Cki1 log2 Werte normalisiert auf Wildtyp XYD, Ras^{val19} 0,56 und *cdc123-Δ326* Ras^{val19} 0,55, Abbildung 4-30). Somit bleibt die Vermutung weiter bestehen, dass der beschleunigte Zellzykluseintritt in der *cdc123-Δ326* Ras^{val19}-Mutante durch die erhöhte PKA-Aktivität vermittelt wird.

Die Deletion von *PDE2* führte ebenfalls zu einer erhöhten PKA-Aktivität vor allem in der *cdc123-Δ326 pde2Δ*-Mutante. Die verstärkte Cki1-Phosphorylierung war allerdings nicht auf demselben Niveau wie bei Ras^{val19} (Quotient Cki1P/Cki1 log2 Werte normalisiert auf Wildtyp XYD, *pde2Δ* 0,2, *cdc123-Δ326* -0,26, und *cdc123-Δ326 pde2Δ* 0,07, Abbildung 4-30). Obwohl in der *cdc123-Δ326 pde2Δ*-Mutante etwa das Wildtyp-Niveau an phosphorylierten Cki1 vorlag, konnte in der Doppelmutante (*cdc123-Δ326 pde2Δ*) der Eintritt in den Zellzyklus nicht verbessert werden. Bei der Deletion von *RAS2* hätte man eine verringerte PKA-Aktivität, so wie es bei der Überexpression von *PDE2* der Fall war, erwartet. Allerdings führte die Deletion zu einer leichten Aktivitätssteigerung in der *cdc123-Δ326 ras2Δ*-Mutante im direkten Vergleich zu *cdc123-*

$\Delta 326$ (Quotient Cki1P/Cki1 log2 Werte normalisiert auf Wildtyp XYD, *ras2* Δ 0,02, *cdc123*- $\Delta 326$ -0,26 und *cdc123*- $\Delta 326$ *ras2* Δ -0,15, *pTEF2-PDE2* -0,52 und *cdc123*- $\Delta 326$ *pTEF2-PDE2* 0,35, Abbildung 4-30).

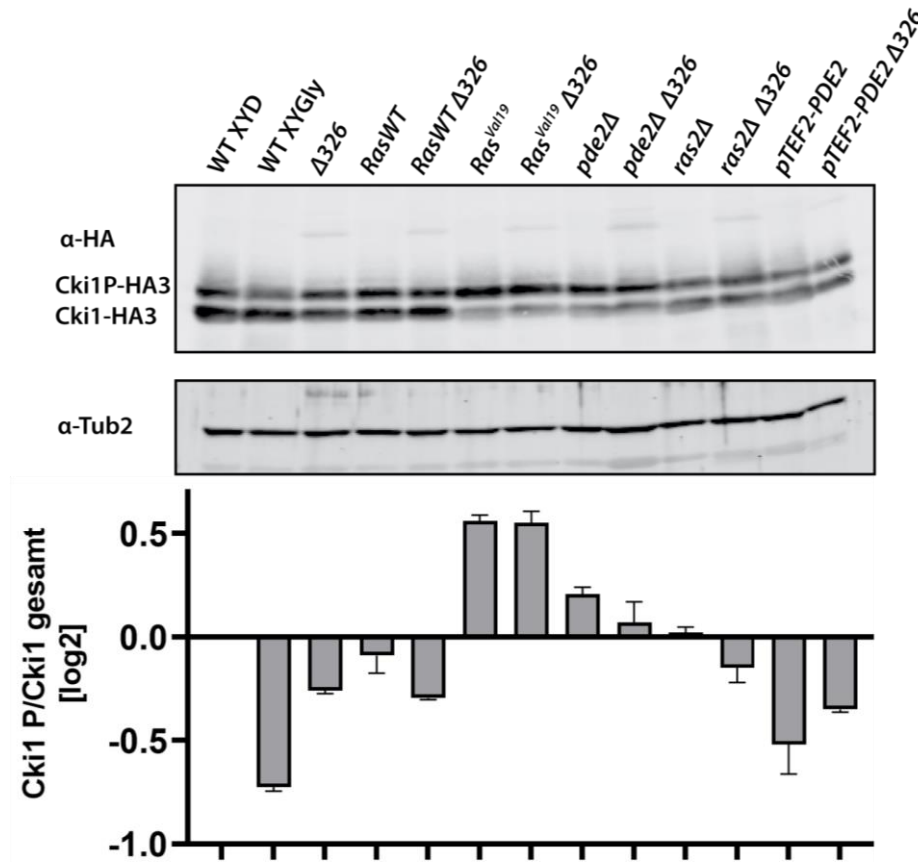


Abbildung 4-30: PKA-Aktivitätsbestimmung durch Cki1. Verwendete Stämme: W17566 (*pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)(WT)), W17568 (*cdc123*- $\Delta 326$ *pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17582 (*pRAS2-RAS2-rRAS2 pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17586 (*cdc123*- $\Delta 326$ *pRAS2-RAS2-rRAS2 pTEF2-pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17591 (*pRAS2-RAS2(G19V)-rRAS2 pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17595 (*cdc123*- $\Delta 326$ *pRAS2-RAS2(G19V)-rRAS2 pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17598 (*pde2* Δ *pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17600 (*cdc123*- $\Delta 326$ *pde2* Δ *pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17575 (*ras2* Δ *pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17577 (*cdc123*- $\Delta 326$ *ras2* Δ *pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)), W17602 (*pTEF2-FLAG-PDE2 pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)) und W17604 (*cdc123*- $\Delta 326$ *pTEF2-FLAG-PDE2 pTEF2-HA4-CKI1* (2-200)). Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus den exponentiell, über Nacht in XYD und W17566 auch in XYGly bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt. Für die Western-Analyse wurden 2 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Cki1 mit einem HA-spezifischen Antikörper α -HA 12CA5. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen, hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α -Tubulin2 (Tub2). Mithilfe der Image Studio Software wurde die Bandenintensität von Cki1P (phosphoryliert) und Cki1-Gesamt (oben und unten) ermittelt und in Beziehung gesetzt. Alle berechneten Werte wurden daraufhin auf den Wildtyp XYD normiert (n=2). Aufgetragen sind die log2 Werte der Mittelwerte sowie die Standardabweichung.

Es konnte zudem kein großer Unterschied zwischen *pTEF2-PDE2* und *cdc123*- $\Delta 326$ *pTEF2-PDE2* festgestellt werden. Vor allem im Wildtyp konnte nach der Überexpression von *PDE2* eine starke Veränderung des Zellzykluseintritts festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-29). Der langsame Zellzykluseintritt in *pTEF2-PDE2*-Mutanten könnten demnach eine Folge der verminderten PKA-Aktivität sein. In der eIF2-Mutante bleibt die Vermutung weiter bestehen, dass

eine verminderte PKA-Aktivität partiell für den verlangsamten Zellzykluseintritt verantwortlich ist. Hierbei spielt womöglich der reduzierte glykolytische Fluss eine Rolle, da Ras2 nicht aktiviert und somit weniger cAMP gebildet werden kann. Durch die Reaktivierung von Ras2 in der eIF2-Mutante liegt die PKA aktiver vor und die Zellen können daraufhin schneller in den Zellzyklus eintreten. Das Wachstum der eIF2-Mutanten wurde jedoch nicht durch die erhöhte PKA-Aktivität stimuliert.

Neben des Phosphorylierungsstatus von Cki1 wurde zusätzlich das PKA-Target, Maf1, betrachtet. Dieses Target ändert je nach PKA-Aktivität seine Lokalisation (Moir et al., 2006). Bei hoher PKA-Aktivität wird Maf1 phosphoryliert und verweilt im Cytoplasma. Liegt eine geringe Aktivität vor, wird Maf1 in den Nukleus importiert und inhibiert dort die Pol III (Anhang Abbildung 10-7 A). Die Untersuchung der Kernlokalisation von Maf1 ergab nach Normalisierung keinen signifikanten Unterschied der *cdc123-Δ326*-Mutante zum Wildtyp (Anhang Abbildung 10-7 B). Da jedoch neben der PKA auch Sch9 die Lokalisation von Maf1 reguliert (Lee et al., 2009), könnte dies der Grund für die Ähnlichkeit von Wildtyp und Mutante sein. Das im Kern-lokalisierte Maf1, ist für die Inhibierung der Pol III verantwortlich. Durch Deletion des Proteins kann somit eine stärkere Aktivität von Pol III angenommen werden. Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Pol III-Aktivität zu einem besseren Wachstum und zu einem schnelleren Zellzykluseintritt führen würde, wurde die Deletion von *MAF1* in der *cdc123-Δ326*-Mutante untersucht. Die Ergebnisse lieferten kein verbessertes Wachstum, auch erfolgte kein schnellerer Zellzykluseintritt der *cdc123-Δ326*-Mutante. Die Deletion führte eher zu einem gegenteiligen Effekt (1C-Zellen *cdc123-Δ326* 36% und *cdc123-Δ326 maf1Δ* 40%, Anhang Abbildung 10-7 C-E).

Die Untersuchung des PKA-Stoffwechselwegs ergab, dass die Hyperaktivierung von Ras (Ras^{val19}) in der *cdc123-Δ326*-Mutante zu einem verbesserten Zellzykluseintritt und zu einer erhöhten PKA-Aktivität führt (vgl. Abbildung 4-28, Abbildung 4-30). Die verstärkte Expression von *PDE2* und die damit verbundene verminderte PKA-Aktivität führte zu einem starken Zellzyklus-Effekt (vgl. Abbildung 4-29, Abbildung 4-30). In der eIF2-Mutante liegen mRNAs der glykolytischen Enzyme verringert vor (vgl. Abbildung 4-24). Eine Folge davon könnte ein verminderter Fluss der Glykolyse sein. Vermutlich wird dadurch das Stoffwechselintermediat Fruktose-1,6-Bisphosphat in geringerer Menge produziert. Eine Folge davon ist, dass weniger GTP-gebundenes Ras2 in den eIF2-Mutanten vorliegt, was zu einer verringerten PKA-Aktivität führt. Es konnte gezeigt werden, dass die verringerte PKA-Aktivität (*pTEF-PDE2*) einen verspäteten Zellzykluseintritt zur Folge hat. In der eIF2-Mutante konnte der Zellzykluseintritt, durch die Erhöhung der PKA-Aktivität (Ras^{val19}), teilweise wiederhergestellt werden.

4.4.2.3 Analyse der Pyruvatkinase

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Kapiteln deuten stark auf einen verlangsamten glykolytischen Fluss in den eIF2-Mutanten hin. Um den Ablauf der Glykolyse in den Translations-initiationsmutanten weiter zu charakterisieren, wurden hier die nächsten wichtigen Schritte,

Fruktose-1,6-Bisphosphat bis Pyruvat, näher analysiert. Hierfür wurde die Lokalisation von vier Enzyme der Glykolyse im Wildtyp und in der eIF2-Mutante untersucht (Abbildung 4-31 A-D). Es konnte festgestellt werden, dass die Glycerinadehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Tdh3), die 3-Phosphoglyceratkinase (Pgc1) und die Enolase (Eno1) keinen sichtbaren Unterschied zwischen beiden Genotypen hervorbrachte (Abbildung 4-31 A-C). Bei der Betrachtung der Pyruvatkinase, Cdc19, war jedoch ein deutlicher Unterschied erkennbar. Im Wildtyp konnten Kondensate detektiert werden, die in der *cdc123-Δ326*-Mutante nicht auftraten (Abbildung 4-31 D). Schon in der Literatur wurden Cdc19-Aggregate beschrieben. Glykolytische Körper konnte unter Hypoxie-Bedingungen, also bei hochregulierter Glykolyse, von einer Arbeitsgruppe gefunden werden (Jin et al., 2017). Diese wurden jedoch auch unter gleichen Hypoxie-Bedingungen bei Eno2 und Pfk1/2 detektiert. In den eigenen Daten lagen aerobe Bedingungen vor und die Kondensate waren nur bei dem Cdc19-GFP detektierbar.

Die Pyruvatkinase katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und generiert ATP (Jurica et al., 1998). Dieser Schritt gehört demnach zu den essenziellen Schritten in der Glykolyse. In der Hefe codieren zwei Gene für diese Kinasen (*CDC19*, *PYK2*). Cdc19 ist für die Katalyse und das Wachstum der Zellen in Glukose essenziell (Boles et al., 1997). Das Enzym liegt als Tetramer aktiv vor, wobei die Tetramerbildung durch Bindung von Fruktose-1,6-Bisphosphat reguliert wird (Cereghetti et al., 2018; Saad et al., 2017)). Wie der Name schon andeutet, ist *CDC19* auch am Zellzyklus beteiligt (Hartwell et al., 1973). Auf Medium mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen kann die *CDC19*-Deletionsmutante nicht wachsen (Sprague, 1977). Die Analyse der RNA-Seq-Daten ergab, dass *CDC19* zu den 10 am häufigsten vorkommenden mRNAs im Wildtyp gehört (Abbildung 4-31 E, siehe Anhang 10.1). Es stellte sich somit die Frage, ob die Kondensatbildung von Cdc19-GFP im Wildtyp mit einer erhöhten Proteinmenge einhergeht. Hierfür wurden die RNA-Seq-Daten der vorherigen Enzyme (Tdh3, Pgc1 und Eno2) mit denen vom Cdc19 verglichen (Abbildung 4-31 E). Um die Proteinmenge der unterschiedlichen Enzyme direkt zu vergleichen, wurde zusätzlich eine Western-Analyse durchgeführt (Abbildung 4-31 F).

Die Glycerinadehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Tdh1-3) gehört zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen in der Hefe (McAlister & Holland, 1985). Tdh1-3 katalysiert den Schritt von Glycerinadehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (vgl. Abbildung 4-24), wobei die Tdh1 eher in stationären Zellen synthetisiert wird (Delgado et al., 2001). In der RNA-Sequenzierung ist *TDH3* in beiden Stammhintergründen das Gen mit dem höchsten Expressionslevel (Abbildung 4-31 E, siehe Anhang 10.1). Auch die Western-Analyse ergab eine höhere Proteinmenge als bei den zuvor untersuchten Enzymen Hxk2 und Pfk1,2 (Abbildung 4-31 F). Die 3-Phosphoglyceratkinase (Pgc1) katalysiert den nächsten Schritt der Glykolyse (vgl. Abbildung 4-24), hierbei wird ATP produziert. Genauso wie *TDH3* gehört *PGK1* zu den am häufigsten vorkommenden mRNAs in der Hefe (Holland & Holland, 1978). Auch mit den neusten Methoden, dem RNA-Seq, konnten diese Daten bestätigt werden (Abbildung 4-31 E, siehe Anhang

10.1). In der Western-Analyse wurde außerdem eine erhöhte Proteinmenge detektiert (Abbildung 4-31 E-F).

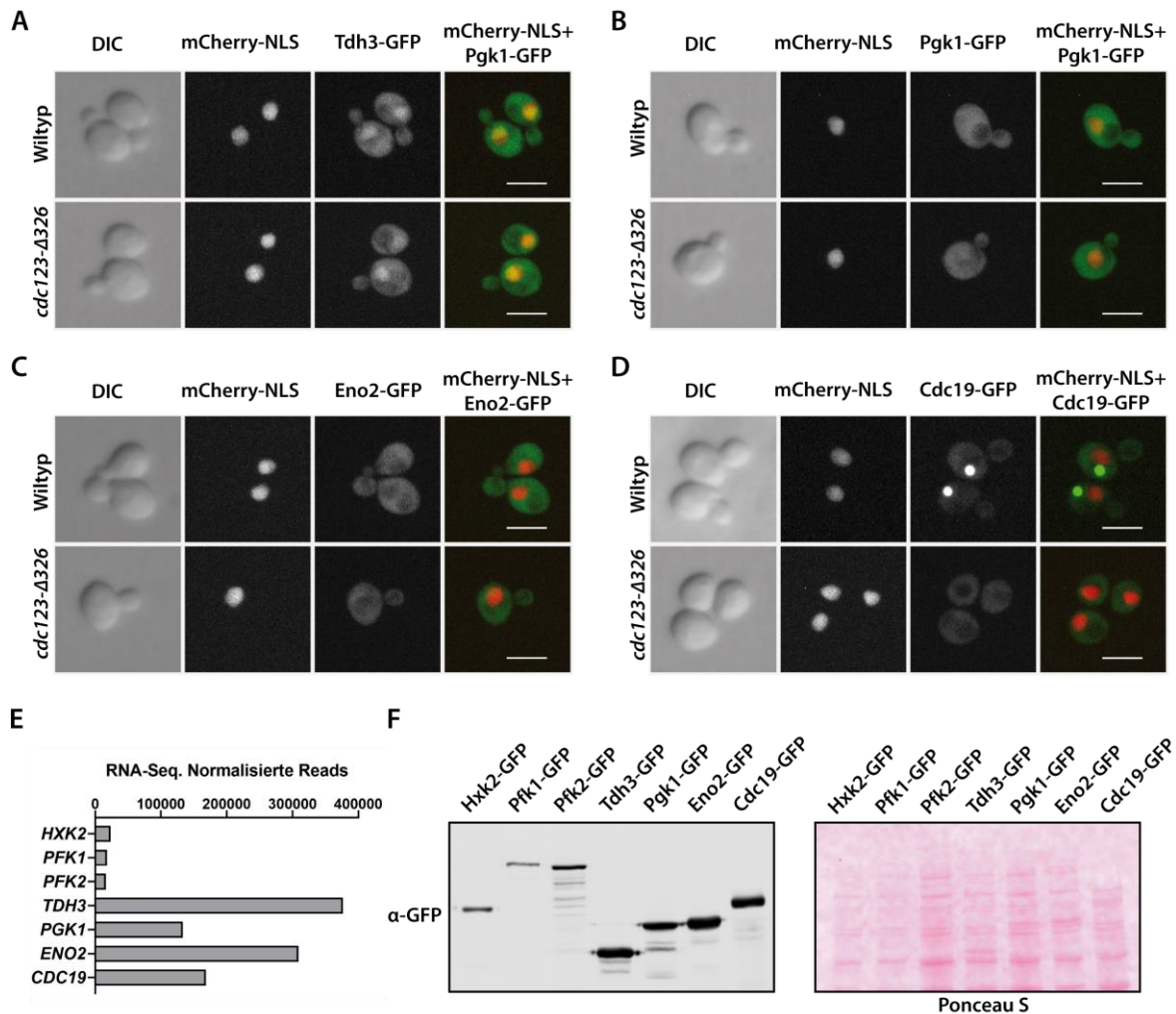


Abbildung 4-31: Untersuchung der Gene, die am stärksten in Hefe exprimiert werden. **A-D**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verwendete Stämme in **A**, W18012 (*mCherry-NLS TDH3-GFP*), W18010 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS TDH3-GFP*), in **B**, W17739 (*mCherry-NLS PGK1-GFP*) W17740 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS PGK1-GFP*), in **C**, W18015 (*mCherry-NLS ENO2-GFP*) W18021 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS ENO2-GFP*), in **D**, W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17174 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS CDC19-GFP*). **E**, Vom K699 die RNA-Sequenzierungsdaten „Reads“ der mRNAs, die für die glykolytischen Enzyme codieren (siehe Anhang 10.1). *TDH3* hatte die meisten „Reads“ in beiden Stammhintergründen. **F**, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: Stämme W17189 (*mCherry-NLS HXK2-GFP*) W17733 (*mCherry-NLS PFK1-GFP*), W17736 (*mCherry-NLS PFK2-GFP*) W18012 (*mCherry-NLS TDH3-GFP*), W17739 (*mCherry-NLS PGK1-GFP*), W18015 (*mCherry-NLS ENO2-GFP*) und W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*) Für die Western-Analyse wurden 0,5 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen Der Nachweis erfolgte für die Enzyme mit einem GFP-spezifischen Antikörper, α - GFP (mAB). Als Ladekontrolle wurde die PonceauS-Färbung, die das gesamte Proteom darstellt, herangezogen.

In der Hefe gibt es zwei Gene, die für die Enolase codieren (*ENO1/2*). Diese Enzyme katalysieren den Schritt von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat (vgl. Abbildung 4-24). *ENO2*

liegt, wenn die Zellen mit Glucose wachsen, stark exprimiert vor, wohingegen *ENO1* unabhängig von der Kohlenstoffquelle in gleicher Menge abgelesen wird (Cohen et al., 1987). Auch bei *ENO2* konnte aus den RNA-Seq-Daten eine starke Expression festgestellt werden (Abbildung 4-31 E, siehe Anhang 10.1). Nicht nur die mRNA-Menge war sehr hoch, eine erhöhte Proteinmenge in den Hefezellen konnte ebenfalls detektiert werden (Abbildung 4-31 F).

Aus der Western-Analyse wurde deutlich, dass die hier beschriebenen Enzyme in der Hefe stark exprimiert vorlagen. Diese Enzyme sind so abundant, dass diese sogar bei näherer Betrachtung im PonceauS, also bei der Anfärbung des gesamten Proteoms, detektierbar waren. Hier kann die Verschiebung der einzelnen Proteingrößen aufgrund der GFP-Markierung nachvollzogen werden (Abbildung 4-31 F rechts). Die höchste Proteinmenge wurde von Tdh3 und Eno2 detektiert (Abbildung 4-31 F). Die Menge von Cdc19 war ebenfalls sehr hoch, jedoch etwas geringer als von Tdh3 und Eno2. Beide Enzyme lagen verteilt im Cytoplasma vor. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Kondensat von Cdc19-GFP nicht ein Artefakt der starken Proteinanhäufung war. In der *cdc123-Δ326*-Mutante wurde ebenfalls eine Western-Analyse durchgeführt. Hier wurde etwas weniger Protein detektiert (Anhang Abbildung 10-8 A).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Kondensat von Cdc19-GFP unter optimalen Wachstumsbedingungen nur im Wildtyp detektiert war. In der *cdc123-Δ326*-Mutante war unter gleichen Wachstumsbedingungen kein bzw. nur selten Kondensat erkennbar. Die anderen stark abundanten Enzyme der Glykolyse bildeten im exponentiellen Wachstum mit Glukose und Sauerstoff kein Kondensat (vgl. Abbildung 4-31 A-D). Das gefundene Cdc19-GFP-Kondensat wurde unter diesen Wachstumsbedingungen noch nicht in der Literatur beschrieben. Aus den genannten Gründen war es von Interesse, die Kondensatbildung von Cdc19-GFP in unterschiedlichen Bedingungen zu analysieren.

Ein Unterschied zwischen Wildtyp und der eIF2-Mutante ist die erhöhte Gcn4-Menge (vgl. 4.1.1). Es konnte zudem durch das RNA-Seq gezeigt werden, dass die Expression der Gcn4-Targets erhöht vorlag (vgl. Abbildung 4-10). Da in der eIF2-Mutanten kein Kondensat von Cdc19-GFP detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Kondensate und der Gcn4-Menge besteht. Hierfür wurden Stämme generiert, die neben dem GFP markierten Cdc19 eine *GCN4*-Deletion trugen. In der Mikroskopie wurde deutlich, dass in den *gcn4Δ*-Zellen ähnlich viele Kondensate wie im Wildtyp detektiert werden konnten. In der Doppelmutante (*cdc123-Δ326 gcn4Δ*) waren weiterhin keine bzw. nur selten Kondensate sichtbar (Abbildung 4-32 A). Um einen geeigneten Eindruck über den Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erhalten, wurden je 4 mal 50 Zellen zufällig ausgewählt und die Anzahl der Zellen mit Kondensat gezählt. Das Ergebnis wurde in einem Barplot aufgetragen und die Signifikanz berechnet. In Abbildung 4-32 B ist neben den *gcn4Δ*- und *cdc123-Δ326 gcn4Δ*-Mutanten auch der Wildtyp und die Einfachmutante (*cdc123-Δ326*) darge-

stellt. Der Unterschied zwischen den Genotypen ist deutlich zu erkennen. Sobald die Verkürzung von Cdc123 in den Zellen vorlag, konnten kaum Kondensate gefunden werden (Mittelwerte Wildtyp 78%, *gcn4*Δ 74%, *cdc123*-Δ326 0,3% und *cdc123*-Δ326 *gcn4*Δ 3 %, Abbildung 4-32).

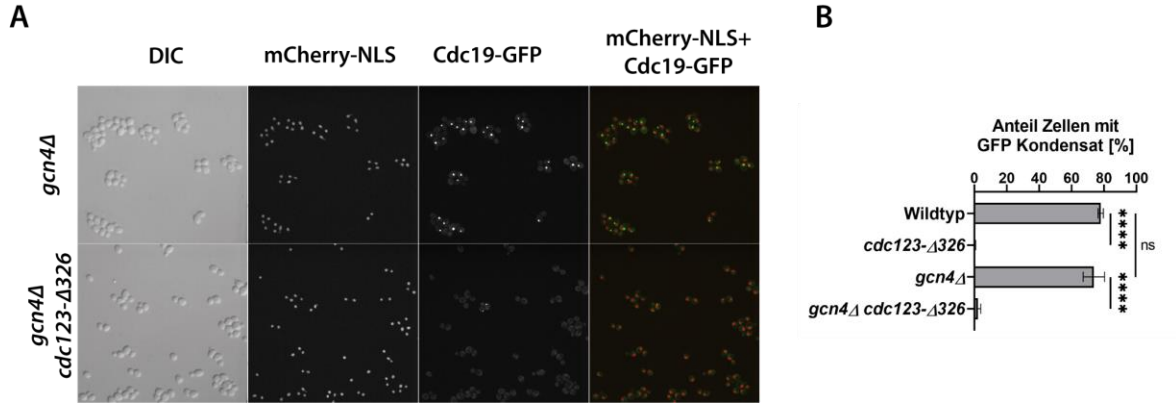


Abbildung 4-32: Einfluss von Gcn4 auf Cdc19-GFP-Kondensate. **A**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17682 (*gcn4*Δ *mCherry-NLS CDC19-GFP*) und W17683 (*cdc123*-Δ326 *gcn4*Δ *mCherry-NLS CDC19-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B**, In der Auswertung ebenfalls aufgeführt W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*, Wildtyp) und W17174 (*cdc123*-Δ326 *mCherry-NLS CDC19-GFP*). Für die Quantifizierung der Zellen mit Cdc19-GFP-Kondensat wurden 4x 50 Zellen zufällig ausgewählt und die Zellen mit einem Kondensat prozentual dargestellt. Zu sehen sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte, bei Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test, durch einen ungepaarter t-Test. Wenn keine Normalverteilung vorlag, durch den Mann-Whitney Test. Signifikanz: ns= nicht signifikant, **** $p < 0,0001$.

In den eIF2-Mutanten wurde eine verstärkte Expression der Glukose-reprimierten Gene festgestellt (vgl. Abbildung 4-17). Der Transkriptionsrepressor Mig1 ist, wie schon in 4.4.1 beschrieben, mitverantwortlich für die Glukose-Repression dieser Gene. Eine Annahme war, dass in der *cdc123*-Δ326-Mutante eine erhöhte Snf1-Aktivität vorlag. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Glukose-Repressionsweg und der Cdc19-GFP-Kondensatbildung besteht, wurden weitere Deletionsstämme mit dem GFP markierten Cdc19 hergestellt. Die Deletion des Repressors *MIG1* brachte keinen signifikanten Unterschied in der Cdc19-GFP-Kondensatmenge hervor (Wildtyp 78%, *mig1*Δ 70%, Abbildung 4-33 A-B). Wie schon zuvor in Abbildung 4-19 gezeigt, führte die Deletion von *MIG1* zu keinem veränderten Wachstum und zu keinem verspäteten Zellzykluseintritt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die noch wildtypische Menge an Cdc19-GFP-Kondensate. Die Deletion und auch die Überexpression von *SNF1* hingen, führte zu signifikant weniger Kondensaten im Vergleich zum Wildtyp (Wildtyp 78%, *snf1*Δ 63% und *pTEF2 SNF1* 56%, Abbildung 4-33 A-B). Die Deletion von *SNF1* würde für eine verbesserte Glukose-Repression sorgen. Allerdings wuchsen die Zellen durch die Deletion schlechter und mehr Zellen lagen in der G1-Phase vor (vgl. Anhang Abbildung 10-6). In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass Snf1 noch an weiteren zellulären Entwicklungsprozessen beteiligt ist (Hedbacker & Carlson, 2009). Aus diesem Grund ist eine Aussage der

verminderten Kondensatmenge in dieser Mutante schwierig. Die Überexpression von *SNF1* hatte keine großen Auswirkungen auf das Wachstum (Daten nicht gezeigt), jedoch führt dieser Genotyp zu einer deutlichen Reduktion der Kondensate. Dies könnte daran liegen, dass die Überexpression von *SNF1* zu mehr aktiven Snf1 führt. Die Glukose-reprimierten Gene würden in diesem Stamm verstärkt exprimiert werden.

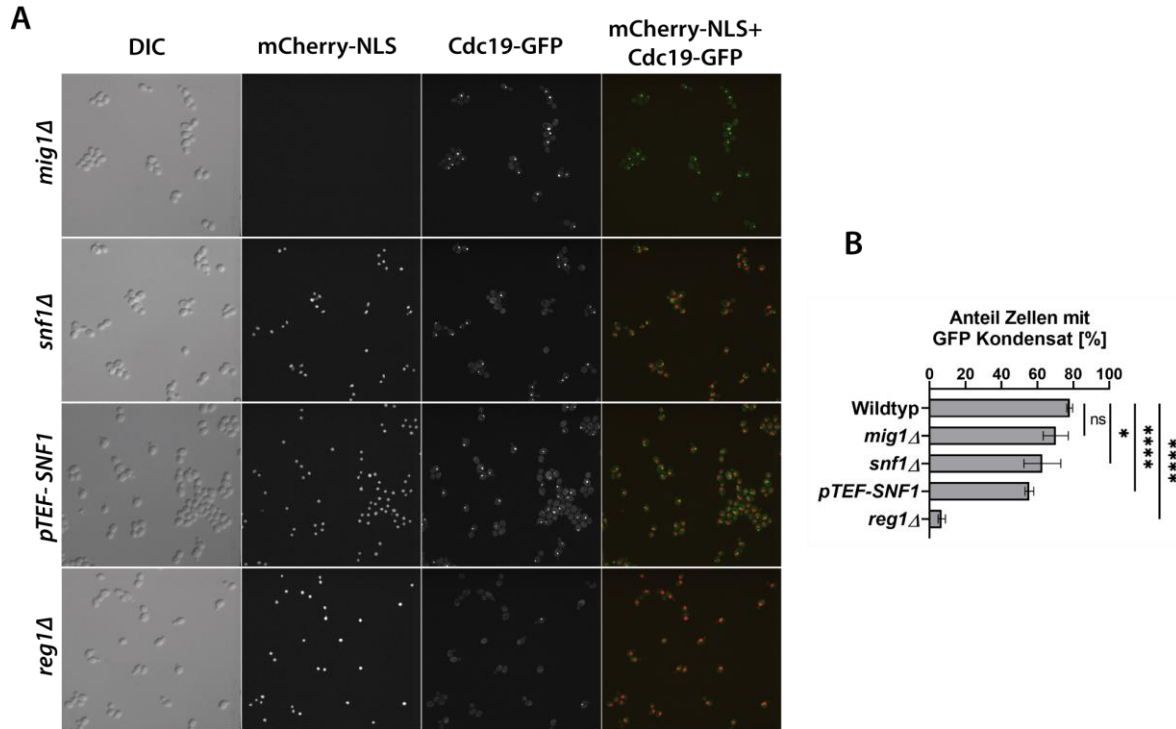


Abbildung 4-33: Cdc19-GFP-Kondensate und Glukose-Repression. A, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17854 (*mig1Δ CDC19-GFP*), W17728 (*snf1Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W18410 (*pTEF2-SNF1 mCherry-NLS CDC19-GFP*) und W18413 (*reg1Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B,** In der Auswertung ebenfalls aufgeführt W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*, Wildtyp). Die Quantifizierung wurde wie in Abbildung 4-32 durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarter t-Test, Signifikanz: ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Die Deletion von *REG1* zeigte eine starke Verminderung der Kondensate (Wildtyp 78%, *snf1Δ* 63% 7%, Abbildung 4-33 A-B). Bei Betrachtung des Zellzyklus mit dieser Deletion konnten mehr 1C-Zellen als im Wildtyp detektiert werden (vgl. Abbildung 4-22). Diese starke Verminderung der Kondensate in *reg1Δ* hängt vermutlich nicht nur mit der erhöhten Menge an G1-Zellen zusammen. Der durch *reg1Δ* vermittelte Effekt könnte mit einer erhöhten Snf1-Aktivität einhergehen. In dieser Mutante liegt eine verminderte Glukose-Repression vor, was ein Auslöser für die reduzierte Cdc19-GFP-Kondensatmenge sein könnte. Die erhöhte *SNF1*-Menge zeigte zwar auch einen Effekt, dieser war allerdings schwächer als in *reg1Δ*. Eine erhöhte Expression von *SNF1* kann allerdings nicht mit einer Aktivitätssteigerung der Kinase gleichgesetzt werden. Dies würde den Unterschied der Cdc19-GFP-Kondensatmenge erklären.

In der eIF2-Mutante konnte eine verminderte PKA-Aktivität festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-30). Es deutet zudem darauf hin, dass ein verminderter glykolytischer Fluss Auslöser für die reduzierte PKA-Aktivität ist (vgl. 4.4.2.2). Außerdem konnten in Cdc19 PKA-Phosphorylierungsstellen gefunden werden (Portela et al., 2006). Es kam die Frage auf, ob die PKA-Aktivität mit den Cdc19-GFP-Kondensaten in Verbindung steht. Hierfür wurden unterschiedliche PKA-Mutanten mit dem Cdc19-GFP-Stamm gekreuzt und unter dem Mikroskop analysiert. Eine deutliche Verminderung der Zellen mit Cdc19-GFP-Strukturen konnte nur in Stämmen mit einer *PDE2*-Überexpression detektiert werden (Wildtyp 78% und *pTEF2 PDE2* 28%, Abbildung 4-34 A-B). Hier wurde auch die deutliche PKA-Aktivitätsminderung (vgl. Abbildung 4-30) ermittelt. Die Überexpression von *PDE2* führt zu einem veränderten Zellzyklus, einer reduzierten PKA-Aktivität und Abnahme der Cdc19-GFP-Kondensate. Es ist denkbar, dass eine verminderte PKA-Aktivität der Auslöser für die reduzierte Cdc19-GFP-Kondensate-Menge ist.

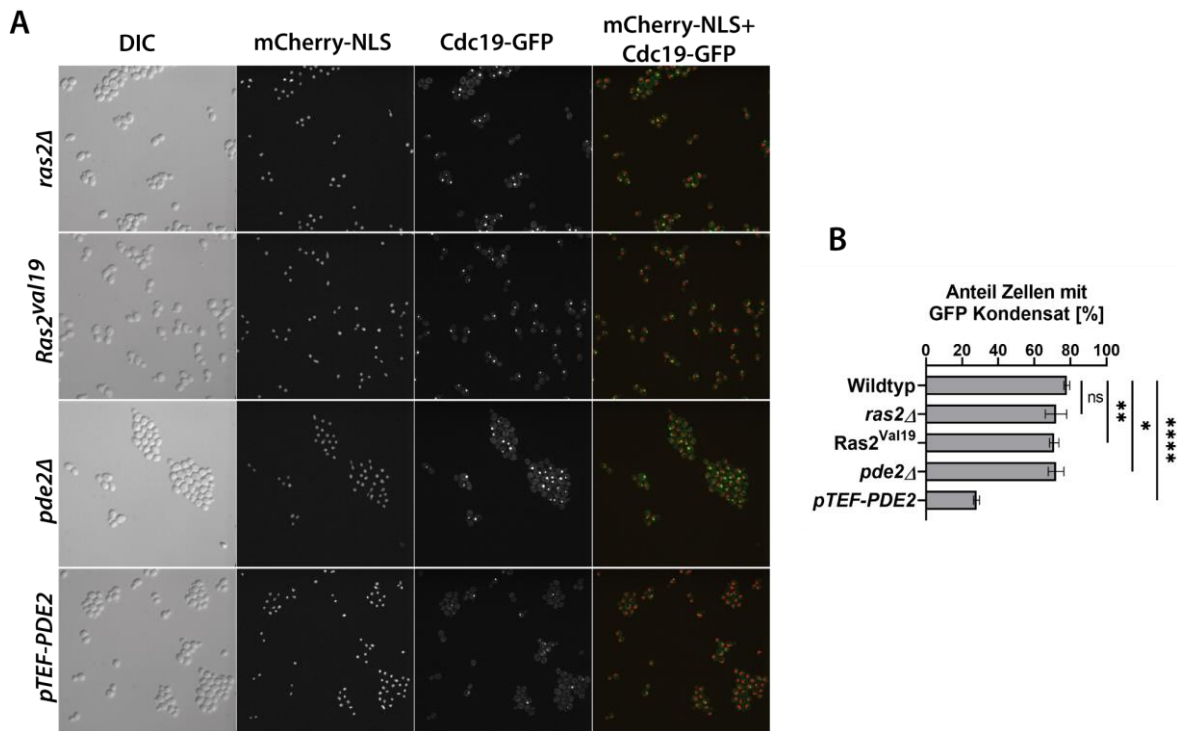


Abbildung 4-34: Cdc19-GFP-Kondensate und PKA. **A**, W17673 (*ras2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17727 (*pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2 mCherry-NLS CDC19-GFP*) W17671 (*pde2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*) und W17680 (*pTEF2-FLAG-PDE2 mCherry-NLS CDC19-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B**, In der Auswertung ebenfalls aufgeführt W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*, Wildtyp). Die Quantifizierung wurde wie in Abbildung 4-32 durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarter t-Test, Signifikanz: ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,003$, **** $p < 0,0001$.

In den anderen Genotypen, bis auf *ras2Δ*, konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Cdc19-GFP-Kondensatmenge detektiert werden, dieser war jedoch sehr gering (Wildtyp 78%, *ras2Δ* 72%, *Ras2^{val19}* 71% und *pde2Δ* 72 %, Abbildung 4-34 A-B). Die PKA-Aktivität wurde durch

ras2Δ nicht beeinträchtigt (vgl. Abbildung 4-30), weshalb eine nicht signifikante Änderung der Kondensatmenge zum Wildtyp nicht überraschend war. Das dauerhaft aktive Ras (Ras^{val19}) sowie die *pde2Δ*-Mutante zeigten 7-8% weniger Cdc19-GFP-Kondensate als der Wildtyp. Eine verringerte PKA-Aktivität in diesen Mutanten kann jedoch ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4-30).

Ein Grund für die reduzierte PKA-Aktivität in der eIF2-Mutante könnte ein verminderter Glykolyse-Fluss sein. In der *cdc123-Δ326*-Mutante konnte weniger Hxk2 detektiert werden (vgl. Abbildung 4-25). Außerdem wurde ein verspäteter Zellzykluseintritt in *hxxk2Δ*- und *pfk2Δ*-Mutanten sichtbar. Beide Enzyme sind somit wichtig für einen wildtypischen Zellzykluseintritt. Um zu testen, ob Mutationen der Enzyme einen Einfluss auf die Cdc19-GFP-Kondensat hat, wurden diese Mutanten ebenfalls hinsichtlich ihrer Strukturbildung untersucht (Abbildung 4-35).

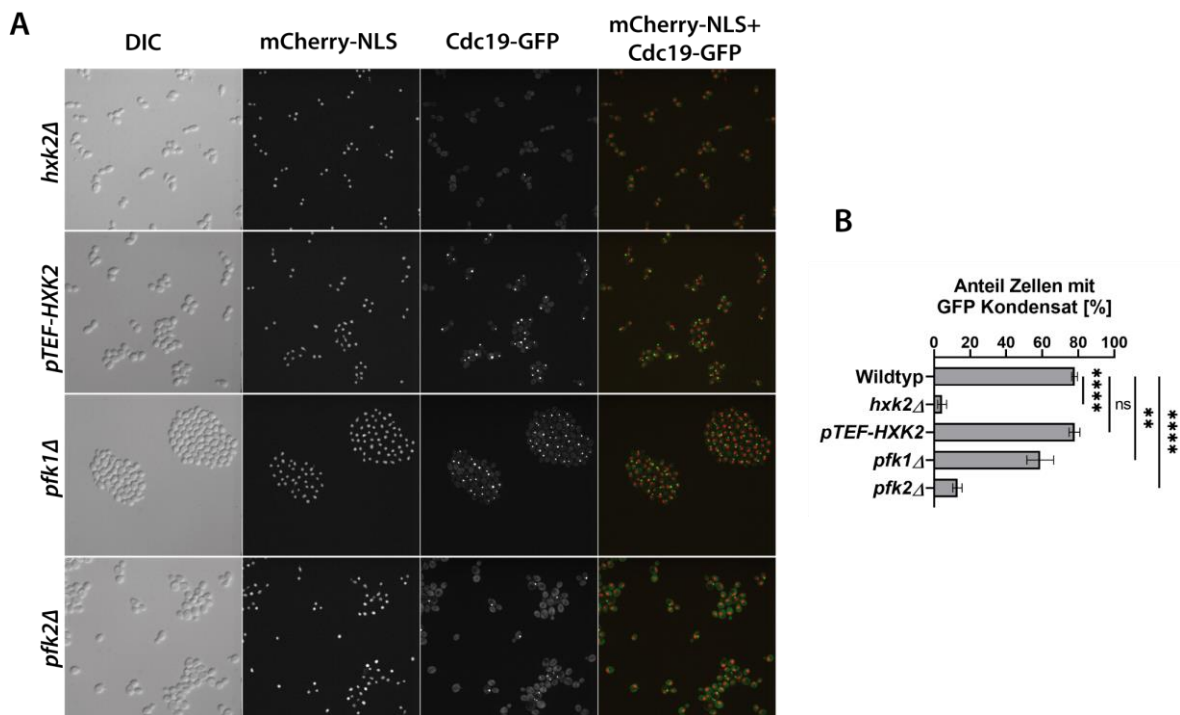


Abbildung 4-35: Cdc19-GFP-Kondensate in Mutanten des Glukose-Stoffwechsels. Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme **A**, W17675 (*hxxk2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17879 (*pTEF2-FLAG3-HXXK2 mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17832 (*pfk1Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17838 (*pfk2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B**, In der Auswertung ebenfalls aufgeführt W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*, Wildtyp). Die Quantifizierung wurde wie in Abbildung 4-32 durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarter t-Test, Signifikanz: ns= nicht signifikant, ** $p < 0,003$, **** $p < 0,0001$.

Auch hier war ein deutliches Ergebnis feststellbar. In beiden Deletionsmutanten (*hxxk2Δ* und *pfk2Δ*) ist ein Cdc19-GFP-Kondensationsverlust deutlich erkennbar und dazu statistisch signifikant (Mittelwerte Wildtyp 78%, *hxxk2Δ* 4,5% und *pfk2Δ* 13 %, Abbildung 4-35 A-B). Auch die Deletion von *PFK1* führte zu einem leicht verzögerten Zellzykluseintritt (vgl. Abbildung 4-27)

und zusätzlich zu weniger Cdc19-GFP-Kondensaten (Mittelwerte Wildtyp 78% und *pfk1Δ* 59%, Abbildung 4-35 A-B). Interessanterweise wurde der größte Kondensationsverlust bei der Deletion von *HXK2* festgestellt, obwohl *pfk2Δ* einen größeren Einfluss auf den Zellzyklus hatte. Die Überexpression von *HXK2* lieferte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 4-35 A-B). Diese Daten sprechen dafür, dass durch eine Reduktion des glykolytischen Flusses, ausgelöst durch die Deletion von *HXK2* und *PFK1/2*, weniger Cdc19-GFP-Kondensate entstehen. In der eIF2-Mutante könnte somit der reduzierte glykolytische Fluss mit für die verminderte Cdc19-GFP-Kondensate verantwortlich sein.

Mit den hier untersuchten Mutanten wurde zusätzlich ein Western-Blot hergestellt, um zu analysieren, ob sich die Cdc19-GFP-Menge stark vom Wildtyp unterschied. In der *hxk2Δ*-Mutante konnte eine verringerte Menge festgestellt werden. In der Überexpression von *PDE2* konnte nach der Quantifizierung jedoch vergleichbar viel Cdc19 detektiert werden (Cdc19-Menge in *hxk2Δ* 70% und in *pTEF2-PDE2* 95% im Vergleich zum Wildtyp (100%), Anhang Abbildung 10-8 A). Es könnte einen Zusammenhang mit der Cdc19-Menge und der Kondensatbildung geben, jedoch wurde auch in der *PDE2*-Überexpression wenig Kondensat detektiert, die Proteinmenge war allerdings ähnlich wie im Wildtyp (vgl. Abbildung 4-34). Somit kann kein direkter Zusammenhang zwischen Cdc19-GFP-Kondensat und Cdc19-Proteinmenge festgestellt werden.

Das Cdc19-GFP-Kondensat wurde außerdem hinsichtlich der Lokalisation näher untersucht. Hierbei erfolgte eine Co-Lokalisation mit Mitochondrien und den Spindelkörpern. Es konnte hier kein Zusammenhang detektiert werden. Die Cdc19-GFP-Kondensate lagen frei im Cytoplasma vor (Anhang Abbildung 10-8 B).

Wie schon erwähnt, wurden in der Literatur Kondensate unter erhöhten glykolytischen, anaeroben Bedingungen detektiert (Jin et al., 2017). In der eIF2-Mutante sowie nach Inhibierung des glykolytischen Flusses, durch Deletion von *HXK2* und *PFK2*, wurden weniger Zellen mit dem Cdc19-GFP-Kondensat gefunden (Abbildung 4-35). Es stellte sich somit die Frage, ob bei der Verwendung anderer Kohlstoffquellen ebenfalls Cdc19-GFP-Kondensate detektiert werden können. Für die Analyse wurde der Wildtyp in verschiedenen Medien angezogen. Diese Medien enthielten entweder Glukose, Raffinose, Saccharose oder Glycerin. In Abbildung 4-36 A sind Übersichtsaufnahmen der einzelnen Bedingungen dargestellt. Aus den Mikroskopiebildern wird ersichtlich, dass nur im Glukose-Medium Kondensate zu sehen sind. Auch in Raffinose wurden vereinzelt Kondensate sichtbar, allerdings sehr wenige (n=100, 5 Zellen hatten ein Kondensat).

In Raffinose läuft die Glykolyse verlangsamt ab, da die Zellen zunächst das Trisaccharid spalten müssen (Zhou et al., 2017). Gene, die für die Atmung codieren, werden in Raffinose dereprimiert (Guaragnella et al., 2013). Glycerin kann nicht in der Glykolyse verwertet werden (Sprague

& Cronan, 1977). In den Zellen mit den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen läuft die Glykolyse vermutlich in einer geringeren Rate oder gar nicht ab. Dies führt wahrscheinlich zu dem Verlust des Cdc19-GFP-Kondensates.

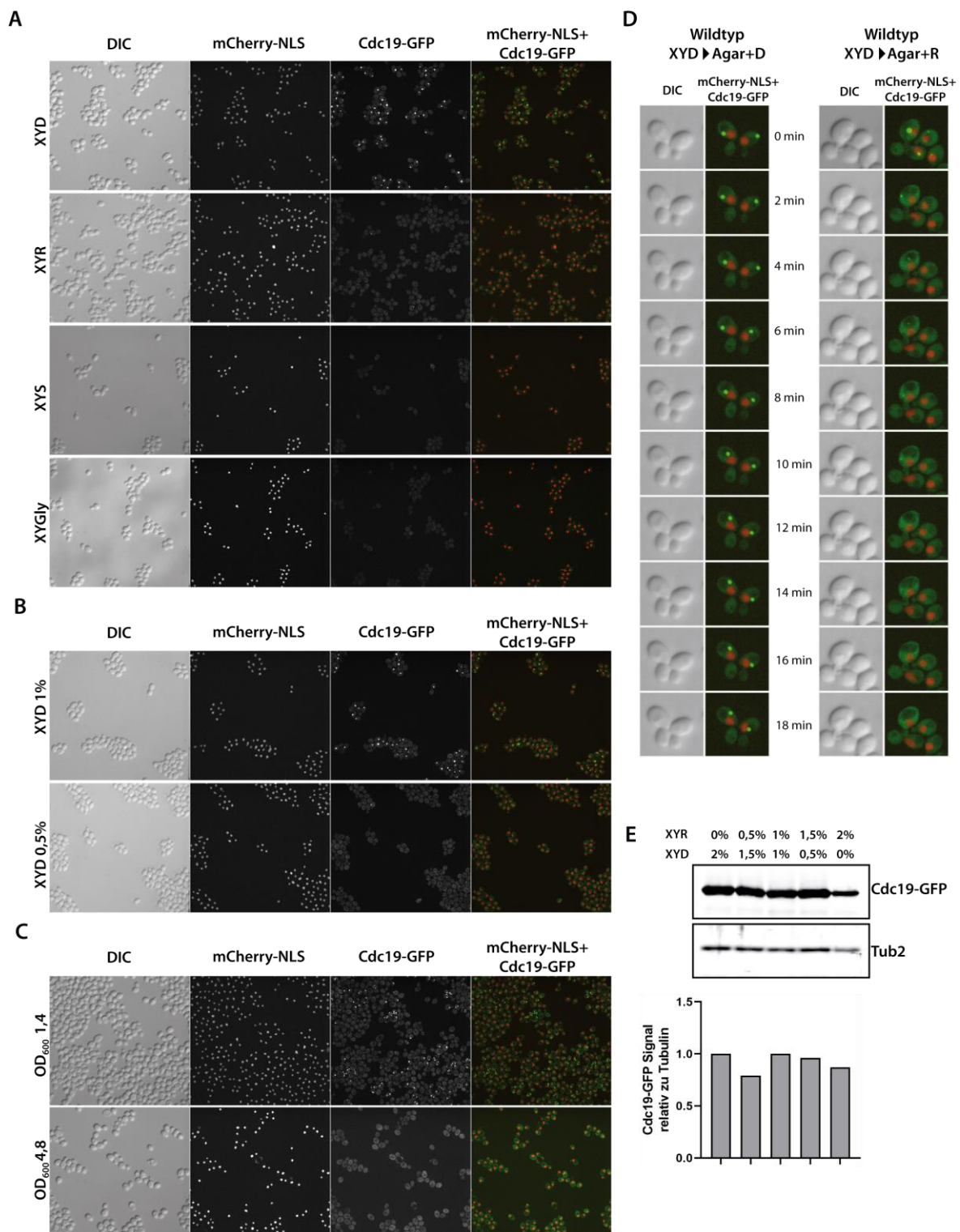


Abbildung 4-36: Cdc19-GFP-Kondensat in Abhängigkeit der Kohlenstoffquellen. Abbildungsbeschreibung auf der nächsten Seite.

Verwendeter Stamm: W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*). **A-B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurde der Stamm über Nacht bei 25°C in XYD/R/S/Gly oder in einer Mischung aus XYD 0,5% und XYR 1,5%, angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter entsprechendem Agar (je nach Medium der Kultur) für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **C**, Der Stamm wurde bei 25°C weiter inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 1,4 bzw. 4,8 auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Weitere Einstellung wie in A-B. **D**, Der Stamm wurde über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen unmittelbar vor dem Mikroskopieren unter einen SD++ und SR++ Agar präpariert. Alle 2 min erfolgte eine Aufnahme. Weitere Einstellung wie in A-B. **E**, Für die Analyse der Proteinmenge wurde der Stamm in unterschiedlichen Medien mit immer gleichbleibender Gesamtkonzentration der Kohlenstoffquelle, 2%, über Nacht bei 25°C angezogen. Bei verringerter Glukosekonzentration wurde die Differenz mit Raffinose aufgefüllt. Für die Western-Analyse wurden 1 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Cdc19 mit einem GFP-spezifischen Antikörper α-GFP (mAB). Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen. Hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2). Mithilfe der Image Studio Software wurde die Bandenintensität von Cdc19-GFP und Tub2 ermittelt und in Beziehung gesetzt. Die berechneten Werte wurden daraufhin auf den 2% Glukose Wert normiert.

Da sich die Cdc19-GFP-Kondensate kaum in schlecht fermentierbaren Kohlenstoffquellen bilden, war es von Interesse, ob eine gewisse Glukosekonzentration für die Bildung notwendig ist. Hierfür wurden Medien vorbereitet, die immer eine Kohlenstoff Gesamtmenge von 2% besaßen. Bei weniger Glukose wurde die Differenz mit Raffinose angeglichen. Die Zellen wurden mit 0,5 und 1% Glukose (Abbildung 4-36 B). War die Glukosekonzentration kleiner gleich 0,5%, so konnten so gut wie keine Cdc19-GFP-Kondensate detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kondensate nur gebildet werden, wenn ausreichend Glukose vorhanden ist und dadurch vermehrt Glykolyse ablaufen kann, unabhängig ob den Zellen Sauerstoff zur Verfügung steht. Dies bestätigt die vorherigen Daten, dass die Bildung des Cdc19-GFP-Kondensates wahrscheinlich von dem glykolytischen Fluss abhängig ist.

Wurden die Zellen länger bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,4 inkubiert, konnten in wenigen Zellen noch Strukturen gesehen werden (n=100, 21 Zellen hatten ein Kondensat). Allerdings war auffällig, dass hier in den Zellen gleich mehrere Kondensate zu finden waren (Abbildung 4-36 C oben). Beim Vergleich mit dem Glukose-Verbrauch in Abbildung 4-6 wird ersichtlich, dass der Wildtyp bei einer OD₆₀₀ von 1,4 noch etwa 15 mg/ml Glukose zur Verfügung hat. Das entspricht etwa 1,5% Glukose. Die detektierten Kondensate sind somit erwartungsgemäß. In Zellen, die noch 12 h länger wuchsen und eine OD₆₀₀ von 4,8 hatten, waren keine Strukturen mehr detektierbar (Abbildung 4-36 C unten). Bei dieser OD₆₀₀ hat der Wildtyp fast die komplette Glukose aufgebraucht (vgl. Abbildung 4-6). Auch hier wird deutlich, dass die Cdc19-GFP-Kondensate nur gebildet werden, wenn ausreichend Glukose verfügbar ist. Der glykolytische Fluss kann, wenn genügend Glukose vorhanden ist, verstärkt ablaufen und Pyruvat wird produziert. Liegt Pyruvat in ausreichender Menge vor, wird es durch die Pyruvat-Decarboxylase zu Acetaldehyd und daraufhin zu Ethanol transformiert (de Alteriis et al., 2018). Pyruvat-Decarboxylase hat eine relativ geringe Pyruvat-Affinität, setzt sein Substrat daher vor allem bei hoher Pyruvat-Konzentration um.

Da die Glukosemenge und die Kohlenstoffquelle entscheidende Faktoren bei der Bildung des Cdc19-GFP-Kondensates waren, eröffnete sich die Frage, wie lange so ein Kondensat beim Wechsel von XYD zu XYR bestehen bleibt. Hierfür wurden die Zellen in Glukose angezogen und entweder unter SD++ oder SR++-Agar präpariert und mikroskopiert. Alle 2 min erfolgte eine Aufnahme (Abbildung 4-36 D). In Zellen, die unter dem SD++-Agar präpariert wurden, blieb das Kondensat im gesamten Aufnahmezeitraum erhalten. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem SR++-Agar, konnte direkt bei Beginn der Aufnahme Cdc19-GFP-Kondensate detektiert werden. Unmittelbar nach der zweiten Aufnahme (nach 2 min), waren die meisten Kondensate aufgelöst. In einer Zelle war das Kondensat noch sehr verkleinert sichtbar, verschwand dann nach 10 min aber komplett (Abbildung 4-36 D). Die Zellen erkennen somit sofort den Wechsel der Kohlenstoffquelle, was eine Auflösung des Kondensates zur Folge hatte. Die Struktur ist somit sehr dynamisch und gleichzeitig von der Kohlenstoffquelle abhängig.

Die Kondensate waren bei 0,5% Glukose bzw. in Raffinose nicht mehr vorhanden waren, aus diesem Grund wurde geprüft, ob die Cdc19-Menge entscheidend für die Bildung der Kondensate war. Hierfür wurden die Zellen in verschiedenen Medien angezogen und im Western-Blot analysiert. Die Cdc19-GFP-Menge wurde daraufhin auf Tubulin bezogenen und auf 2% Glukose normierten. Die quantifizierten Werte der Cdc19-GFP-Menge unterschieden sich kaum. Vor allem bei 0,5% konnte kein Unterschied zu 2% festgestellt werden (Normalisierte Werte auf 2% Glukose, 1,5%=0,8, 1%=1, 0,5%=0,96 und 2% Raffinose 0,9, Abbildung 4-36 E-F). Die Kondensatbildung hängt demnach nicht von der Cdc19-Menge ab, sondern vielmehr davon, mit welcher Kohlenstoffquelle die Zellen gewachsen sind bzw. ob ausreichend Glukose im Medium vorhanden war. Dies deutet daraufhin, dass die etwas geringere Menge von Cdc19 in der *cdc123-Δ326*-Mutante (vgl. Anhang Abbildung 10-8 A) zumindest nicht die Hauptursache für den Kondensatverlust ist. Ein verminderter glykolytischer Fluss in der eIF2-Mutante kann dafür verantwortlich sein, dass kaum Cdc19-GFP-Kondensate detektiert wurden.

In Zellen, die wenig Glukose aufnehmen können, da zum Beispiel keine freie Glukose zur Verfügung steht, läuft der glykolytische Fluss verlangsamt ab (Huberts et al., 2012; Martinez-Ortiz et al., 2019). Bei einem geringeren Fluss werden dementsprechend weniger Intermediate produziert und Pyruvat liegt in einer geringeren Konzentration vor. Die Pyruvat-Dehydrogenase besitzt eine hohe Affinität zum Pyruvat (de Alteriis et al., 2018). Die Metabolisierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA erfolgt durch die Pyruvat-Dehydrogenase bei geringer Pyruvat-Konzentration. Die Zellen beginnen zu atmen. In den eIF2-Mutanten konnte neben der verminderten Expression von Genen, die für Enzyme der Glykolyse codieren, auch die erhöhte Expression von atmungsspezifischen Genen gefunden werden. Zusätzlich war es in der *cdc123-Δ326*-Mutante durch die Deletion des Transkriptionsfaktors *HAP4* möglich, die Mitochondrienstruktur des Wildtyps wiederherzustellen (vgl. Abbildung 4-15). Daraufhin kam die Frage auf, ob durch die Inhibierung der Atmung die Cdc19-GFP-Kondensate in der eIF2-Mutante wiederhergestellt werden können. Da die Deletion von *HAP4* zu einer Atmungsdefizienz führt (vgl. Anhang

Abbildung 10-5 B), wurde *HAP4* für die Analyse gewählt. Die Deletion von *HAP4* führte unter Glukose-Wachstumsbedingungen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Wildtyp 78% und *hap4*Δ 77%, Abbildung 4-37 A). Dies war zu erwarten, da unter diesen Bedingungen *HAP4* nicht verstärkt exprimiert wird (Bolotin-Fukuhara, 2017; Gancedo, 1998) und somit keinen Einfluss auf den Metabolismus hat. In der *cdc123*-Δ*326*-Mutante konnte die Anzahl der Kondensate nicht auf das Wildtyp-Niveau wiederhergestellt werden. Jedoch konnte nach der Auszählung zumindest eine kleine und signifikante Zunahme festgestellt werden (*cdc123*-Δ*326* 0,3% und *cdc123*-Δ*326 hap4*Δ 4,5%, Abbildung 4-37 A Signifikanz $p=0,03$ nach Mann-Whitney). Interessanterweise konnte auch eine starke Minderung der Kondensatmenge nach der *HAP4*-Überexpression detektiert werden. In Kombination mit *cdc123*-Δ*326* konnte in 200 Zellen nicht ein einziges Kondensat gefunden werden (Wildtyp 78%, *pTEF2-HAP4* 41% und *cdc123*-Δ*326 pTEF2-HAP4* <0,5%, Abbildung 4-37 A,D). Auch eine Überexpression von *HAP4* führte zu einer größeren Anzahl von Zellen in der G1-Phase (1C-Zellen Wildtyp 11% und *pTEF2-HAP4* 23%, Anhang Abbildung 10-5 C) und einer vernetzten Mitochondrienstruktur (Anhang Abbildung 10-5 A). In der Western-Analyse wurde keine verminderte Cdc19 Gesamtproteinmenge detektiert (Anhang Abbildung 10-8 A). Die verminderte Cdc19-GFP-Kondensatbildung könnte somit mit einer verringerten Fermentation und gleichzeitig mit einer verstärkten Atmung in Verbindung stehen.

In einer 95-minütigen Zeitaufnahme wurde die Cdc19-GFP-Struktur in der *cdc123*-Δ*326*- und *cdc123*-Δ*326 hap4*Δ- Mutante in XYD beobachtet (Abbildung 4-37 B). In beiden Genotypen konnten Kondensate festgestellt werden. In der Doppelmутante waren zu Beginn des Experiments die Strukturen in wenigen Zellen sichtbar. Dieser Zustand konnte über die Dauer von 95 min aufrechterhalten werden. In der *cdc123*-Δ*326*-Mutante war in einer Zelle erst nach 25 min und für die Dauer von 1 h ein Kondensat zu sehen. Das Auftreten und Verschwinden der Cdc19-GFP-Kondensate deutete auf eine dynamische Struktur hin, deren Stabilität von den metabolischen Bedingungen abhängt.

Durch die *HAP4*-Deletion konnten wieder mehr Kondensate in der *cdc123*-Δ*326*-Mutante entstehen. Daraus ergab sich die Hypothese, dass durch die Hemmung der Atmung die Zellen vermehrt Glykolyse betreiben. Um dies weiter zu analysieren, wurden die *hap4*Δ Stämme in einer anderen Kohlenstoffquelle, Raffinose, betrachtet. Tatsächlich war es möglich, die Menge der Cdc19-GFP-Kondensate durch die Deletion komplett wiederherzustellen (Wildtyp XYD 78%, XYR 2,5% und *hap4*Δ XYR 75%, Abbildung 4-37 C,E). Allerdings entstand der Eindruck, dass die Cdc19-GFP-Kondensate in *hap4*Δ XYR etwas kleiner waren als bei dem gleichen Stamm, der mit Glukose gewachsen ist (Abbildung 4-37 B-C). In der *cdc123*-Δ*326 hap4*Δ-Mutante, die in XYR gewachsen ist, konnten keine Kondensate gefunden werden (Abbildung 4-37 C).

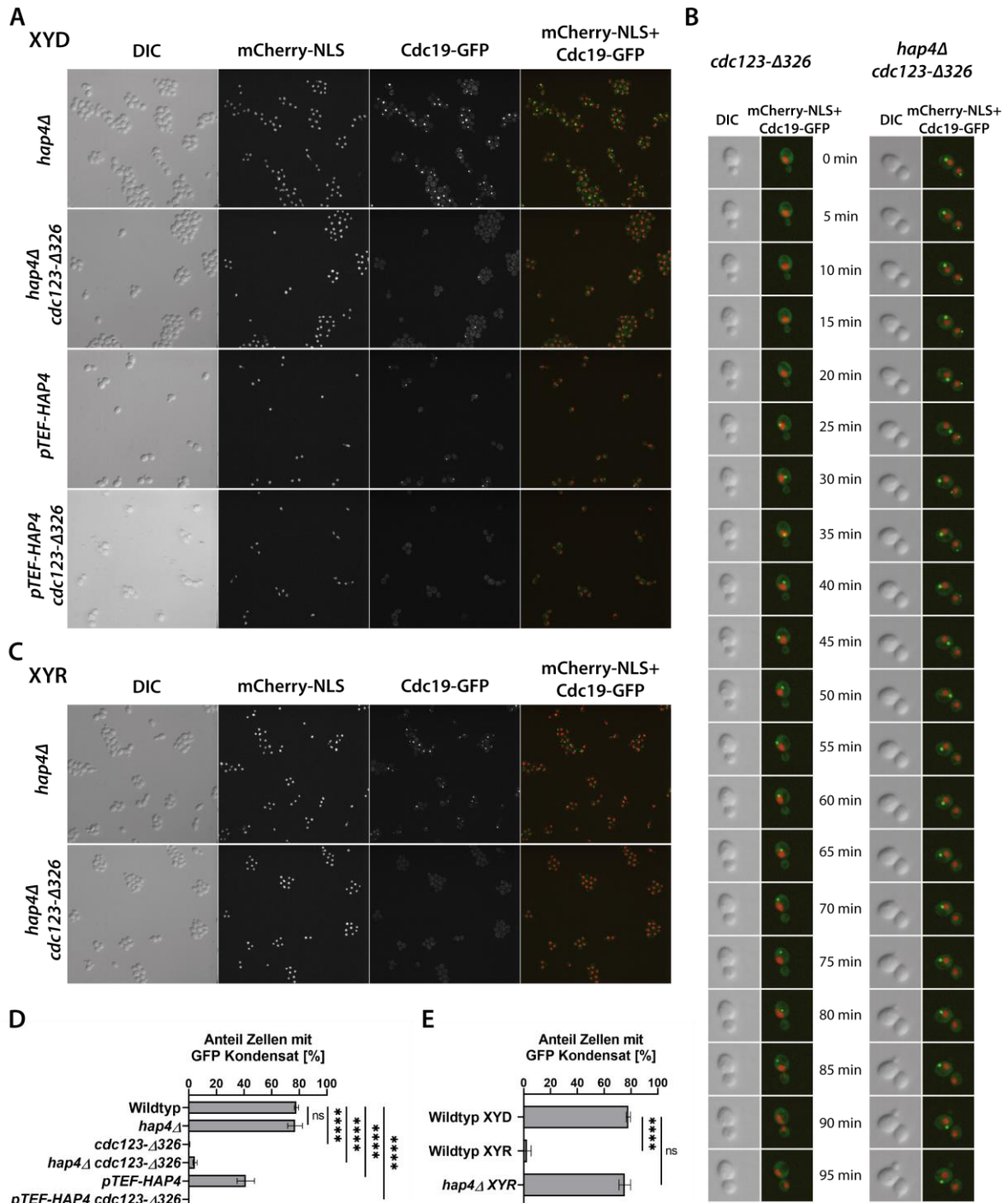


Abbildung 4-37: Atmungsdefizienz führt zur Bildung von Cdc19-GFP-Kondensat. A-C, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme für W17882 (*hap4Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17883 (*cdc123-Δ326 hap4Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17678 (*pTEF2-HAP4 mCherry-NLS CDC19-GFP*) und W18413 (*cdc123-Δ326 pTEF2-HAP4 mCherry-NLS CDC19-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD oder in XYR angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SR++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **B,** Alle 5 min erfolgte eine Aufnahme, 95 min insgesamt. **D,E,** In der Auswertung ebenfalls aufgeführt W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*, Wildtyp) und W17174 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS CDC19-GFP*). Die Quantifizierung wurde wie in Abbildung 4-32 durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte, da eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarten t-Test, Signifikanz: ns= nicht signifikant, **** p<0,0001.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Inhibierung der Atmung (*hap4*Δ) die Zellen in Raffinose-Medium verstärkt Pyruvat produzieren. Da sie nicht mehr atmen können, betreiben sie den fermentativen Stoffwechsel. In der eIF2-Mutante ist die verstärkte Atmung jedoch nicht der Hauptgrund für den Verlust der Cdc19-GFP-Kondensate.

Die Analysen der Cdc19-GFP-Kondensate ergaben, dass in der *cdc123*Δ*326*-Mutante so gut wie keine Strukturen zu finden waren. Die Kondensate sind jedoch kein Artefakt der hohen Proteinmenge, da andere stark exprimierte Enzyme unter gleichen Wachstumsbedingungen keine Strukturen gebildet haben. Auch bei einer hohen Gesamtproteinmenge von Cdc19 wurde eine verminderte Menge der Kondensate detektiert (vgl. Anhang Abbildung 10-8 A, *pTEF-HAP4*). Die Aktivierung von Snf1, vermittelt durch die Deletion von *REG1*, führt ebenfalls zu sehr wenigen Cdc19-GFP-Kondensaten. Durch die Überexpression von *PDE2* und die damit einhergehende Verminderung der PKA-Aktivität wurden ebenfalls weniger Cdc19-GFP-Strukturen gefunden. Die Inhibierung der Glykolyse (*hxxk2*Δ oder *pfk1/2*Δ) führte zu einer reduzierten Menge an Cdc19-GFP-Kondensaten. Zudem war die Bildung des Kondensates abhängig von einer gut fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Durch die Inhibierung der Atmung, vermittelt durch die *HAP4*-Deletion, war es möglich in XYR wieder ein wildtypisches Niveau der Kondensatmenge zu erhalten.

Daraus kann geschlossen werden, dass für die Bildung des Cdc19-GFP-Kondensates der glykolytische Fluss verstärkt ablaufen muss. Sobald die Glykolyse inhibiert wird, liegen in der Zelle weniger Strukturen vor (vgl. Abbildung 4-33, Abbildung 4-36). Durch verstärkte Atmung konnte ebenfalls eine Reduktion der Cdc19-GFP-Kondensate detektiert werden (vgl. Abbildung 4-37). In den eIF2-Mutanten konnte eine verminderte Expression von Genen, die für Enzyme der Glykolyse codieren, gefunden werden (vgl. Abbildung 4-24). Gleichzeitig lagen Glukose-reprimierte Gene verstärkt exprimiert vor (vgl. Abbildung 4-17). Die Expression der atmungsspezifischen Gene war in den Translationsinitiationsmutanten ebenfalls erhöht (Abbildung 4-13, Abbildung 4-14). Alle drei Faktoren spielen somit in den eIF2-Mutante eine Rolle und könnten für den Verlust der Cdc19-GFP-Strukturen verantwortlich sein. Das Cdc19-GFP-Kondensat könnte demnach eine Art Indikator für einen schnellen glykolytischen Fluss und die damit verbundene Fermentation sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine Veränderung in den Glukose-gesteuerten Prozessen durch Inhibierung der Translationsinitiation schließen. In den eIF2-Mutanten konnte eine verstärkte Atmung, gekoppelt mit einem verminderten glykolytischen Fluss beobachtet werden. Der veränderte Glukosemetabolismus könnte für den verlangsamten Zellzykluseintritt der Translationsinitiationsmutanten verantwortlich sein.

5 DISKUSSION

Das Verhalten von *S. cerevisiae* wird durch die Nährstoffumgebung festgelegt. Hierbei spielt Glukose eine zentrale Rolle (Ashe et al., 2000). Die Nährstoffversorgung koordiniert das Wachstum und die Zellteilung der Hefe (Newcomb et al., 2003). Für eine schnelle Proliferation werden in kürzester Zeit viele Proteine benötigt (Lee & Tu, 2017). Nach dem Verbrauch von Glukose verlangsamt sich das Wachstum dramatisch und innerhalb von Minuten erfolgt eine Reduktion der globalen Translation (Ashe et al., 2000; Holmes et al., 2004; Newcomb et al., 2003). Die Translationsinitiation ist eine der wichtigsten Stellschrauben der Genexpression (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). In *S. cerevisiae* sind die Gene, die für die drei Untereinheiten von eIF2 codieren (*SUI2*, *SUI3* und *GCD11*), für die Zellebensfähigkeit essenziell (Schmitt et al., 2010).

Eine durch eIF2 verursachte Störung der Translationsinitiation führt zu einer Inhibierung der globalen Translation (Hinnebusch, 2005). Des Weiteren konnte ein verspäteter Zellzykluseintritt durch die reduzierte eIF2-Funktion beobachtet werden (Weinzierl, 2011). Bei Untersuchung dieses Zusammenhanges wurde festgestellt, dass durch die Inhibierung der Translation eine Umprogrammierung des Glukosemetabolismus stattfindet. Die Mutanten wechseln vom fermentativen zum oxidativen Stoffwechsel. Diese Daten beruhen auf einer genomweiten Transkriptom-Analyse, auf Lokalisationsstudien, auf Untersuchungen der Mitochondrienmorphologie und auf genetischen Wechselwirkungen. Wachstums- und Zellzyklus-Analysen bekräftigen ebenfalls diese Daten. In den eIF2-Mutanten war es möglich, eine verringerte Aktivität von Glukose-induzierten Signalwege (PKA) und eine Erhöhung des Energiemangelsystems (AMPK) zu detektieren.

In Abbildung 5-1 ist ein Model der veränderten Glukose-gesteuerten Prozesse in der eIF2-Mutante im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Liegt dem Wildtyp genügend Glukose vor, wird diese schnell aufgenommen und abgebaut. Die Zellen gären und die Translationsmaschinerie liegt optimal vor, um eine schnelle Proliferation zu fördern (Busti et al., 2010; Lee & Tu, 2017; Newcomb et al., 2003; Abbildung 5-1 A). Glukosemangel führt hingegen zu einen verminderten glykolytischen Fluss, die Zellen respirieren (Huberts et al., 2012). Außerdem sind Glukose-induzierte Prozesse inhibiert und die Glukose-vermittelte Genrepression ist aufgehoben (Elbing et al., 2004; Gancedo, 2008; Peeters et al., 2017). Die Translationsrate ist reduziert und eine geringere Proliferation kann festgestellt werden (Ashe et al., 2000; Holmes et al., 2004; Newcomb et al., 2003). Durch die Inhibierung der Translation konnte anhand der Experimente eine Umprogrammierung des Glukosestoffwechsels ermittelt werden (Abbildung 5-1 B). Eine zentrale Rolle könnte die Snf1-Kinase spielen. So liegt die Vermutung nahe, dass zu wenig Reg1 in der eIF2-Mutante zu einem hyperaktiven Snf1 führt. Eine Dephosphorylierung von Snf1 durch PP1 wäre so nur bedingt möglich. Die daraus verursachten Folgen wären zum einen eine Derepression der Gene, die unter optimalen Wachstumsbedingungen reprimiert vorliegen. Die Zelle hat einen verstärkt oxidativen Metabolismus.

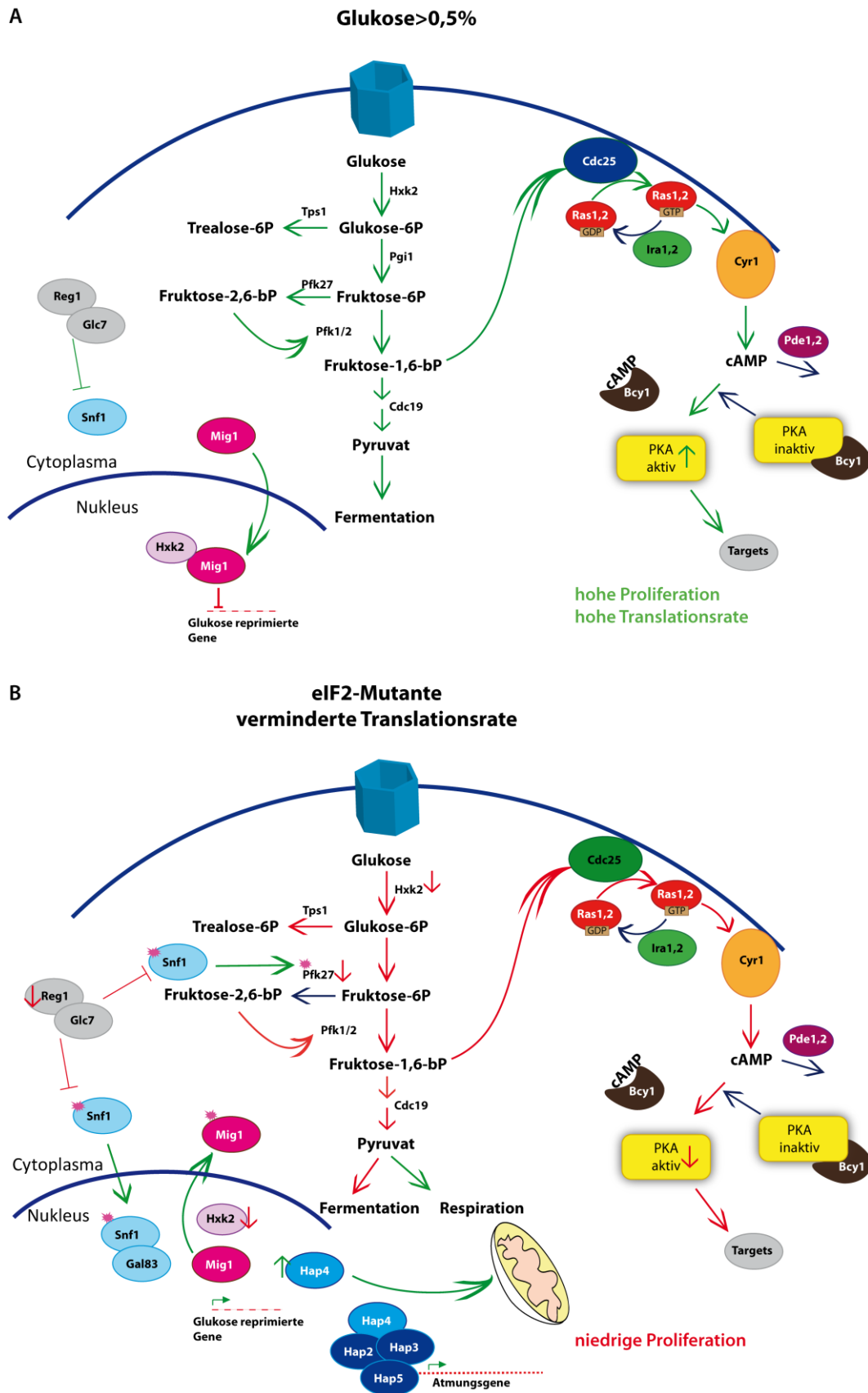


Abbildung 5-1: Model der veränderten Glukose-gesteuerte Prozesse in eIF2-Mutanten. A, Wildtypesituation bei hoher Glukose Konzentration. **B,** veränderte Prozesse in der eIF2-Mutante. Grüne Pfeile stellen die induzierten Wege und die roten Pfeile die reprimierten Wege dar. Blaue Pfeile stellen in dem Modell keine Veränderungen dar. Proteine mit pinken Sternen, sind phosphoryliert.

Zum anderen wäre es denkbar, dass der glykolytische Fluss durch das hyperaktive Snf1 gehemmt wird. Daraus resultiert, neben der verstärkten Atmung, auch eine verminderte PKA-Aktivität. Die eIF2-Mutanten translatieren weniger Proteine, betreiben verstärkt oxidativen Metabolismus und proliferieren folglich langsamer. Es war somit möglich, Ähnlichkeiten zwischen der eIF2-Mutante und einem Wildtyp, dem keine Glukose zur Verfügung steht, zu detektieren.

Dass Glukosemangel zur Inhibierung der Translation führt, wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (Ashe et al., 2000; Holmes et al., 2004). In dieser Arbeit war es möglich den Glukosemetabolismus durch die Inhibierung der Translation zu verändern.

5.1 Einflussfaktoren der Zellzyklusprogression

Schon zuvor konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Depletion einer der eIF2-Untereinheit, sowie die Depletion des Assemblierungsfaktors Cdc123, zu einem Zellzyklusarrest führt. Auch die Depletion des GEF-Faktors von eIF2 führt zu einem G1-Arrest. Interessanterweise war dies nicht der Fall mit anderen Initiationsfaktoren wie eIF4E (5'-Cap-Bindeprotein), eIF5 (eIF2 GAP-Faktor) oder eIF1 (beteiligt bei der AUG-Erkennung). Nach der Depletion dieser Initiationsfaktoren, sowie nach der von Rrn3, einem Protein, welches notwendig für die Transkription der rDNA ist, konnte kein Arrest festgestellt werden (Weinzierl, 2011). Daraus ließ sich schließen, dass der Eintritt in den Zellzyklus empfindlich auf die Funktion von eIF2 reagiert.

Die eIF2-Regulation erfolgt bei Aminosäuremangel durch die Gcn2 vermittelte Phosphorylierung, gefolgt von einer verbesserten *GCN4*-Translation (Hinnebusch, 2005; Zhan et al., 2004). Der Transkriptionsfaktor ist für die verstärkte Expression von Genen, die für die Aminosäure Biosynthese notwendig sind, verantwortlich. Die Untersuchung der eIF2 sensitiven Mutanten ergab eine verstärkte Gcn4-Aktivität in den funktionellen Analysen (vgl. 4.1.1), sowie in der RNA-Sequenzierung (vgl. 4.2.2). Dies verdeutlicht, dass durch die verminderte eIF2-Funktion, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus, die Gcn4-Antwort ausgelöst wird. Die verstärkte Gcn4-Antwort war jedoch nicht für die Zellzyklus-Verschiebung in den Mutanten verantwortlich (siehe 4.1.1). Die Inhibierung der Translationsinitiation, als Folge von Glukosemangel, könnte unterschiedliche Gründe haben. Da die Proteinbiosynthese ein energieintensiver Prozess ist, wird vermutet, dass durch die Inhibierung der ATP-Spiegel aufrechterhalten bleibt (Ashe et al., 2000). Die verminderte Synthese von Proteinen könnte direkt an dem Wechsel der veränderten Genexpression beteiligt sein, da nur die mRNAs translatiert werden, die für alternative Stoffwechsel- oder Wachstumswege nötig sind. Wie in Abbildung 4-17 zu sehen war, werden in den eIF2-Mutanten viele Gene verstärkt exprimiert, die im Zusammenhang mit dem diauxischen Wechsel stehen. Dieses diauxische Verhalten der Mutanten könnte ein Grund für die Zellzyklus-Verschiebung in Richtung G1 sein. Nachdem Glukose verbraucht wurde, durchlaufen die Zellen unterschiedliche Veränderungen. Ein Teil der Zellen, vor allem jedoch die Tochterzellen, gehen in das ruhende Stadium, in die G₀-Phase, über (Allen et al., 2006; Davidson

et al., 2011; Miles et al., 2013). Diese Zellen sind dicht gewachsen, nicht knospend, respirieren und speichern Glukose in Form von Trehalose und Glykogen. In diesen ruhenden Zellen ist der G1/S-Übergang vorerst gestoppt und kann erst wieder stattfinden, wenn die Bedingungen es zulassen. Hierbei spielt die Bindung von Cln3 mit der Cdk und die Aktivierung von START eine entscheidende Rolle. Zu wenig Cln3 führt zu einer längeren G1-Phase und zu größeren Zellen, vergleichbar mit den eIF2-Mutanten sowie den Wildtypzellen, die in Glycerin gewachsen sind (Abbildung 4-5, Abbildung 4-7). Zudem konnten verringerte Mengen an *CLN1/2*, was auf eine verringerte Cln3-Cdk-Aktivität hindeutet, in der *cdc123-Δ326*-Mutante detektiert werden ($\log_2$ *CLN1* -0,51 und *CLN2* -1,64 *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). In der Studie von Miles und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Zellen, bevor sie aufgrund von Glukosemangel in den diauxischen Wechsel eintreten, in der G1-Phase arretieren (Miles et al., 2013). Der globale Repressor Xbp1 liegt in Zellen, die Glukose aufgebraucht haben, verstärkt exprimiert vor und inhibiert die *CLN3*-Transkription (Mai & Breeden, 1997). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine Überexpression von *XBP1* zu langsam wachsenden und großen Zellen führt, in denen die G1-Cycline reprimiert vorlagen (Mai & Breeden, 1997). In den eIF2-Mutanten konnte neben der verringerten *CLN1/2*-Expression eine deutlich erhöhte Transkriptmenge von *XBP1* detektiert werden ($\log_2$ 1,1 in *cdc123-Δ326* und 2,08 in *imt2-4Δ* im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). Weniger *CLN3* konnte nur in der *imt2-4Δ*-Mutante gefunden werden, in der *cdc123-Δ326*-Mutante blieb die Menge unverändert ($\log_2$ -0,63 *imt2-4Δ* im Vergleich zum Wildtyp). Damit identifiziert werden kann, ob Xbp1 in den eIF2-Mutanten einen größeren Einfluss auf den Zellzyklus hat, müssten hier weitere Experimente, wie eine Überexpression, durchgeführt werden.

Wenn der Zelle Glukose zur Verfügung steht, proliferieren sie sehr schnell (Newcomb et al., 2003). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein verminderter glykolytischer Fluss zu einem verspäteten Zellzykluseintritt führt. Durch die Deletion der Gene, die für Schlüsselenzyme (Hxk2 und Pfk2) codieren, wurden mehr G1-Zellen detektiert (vgl. Abbildung 4-25, Abbildung 4-27). Dies kann daran liegen, dass aufgrund von Fruktose-1,6-Bisphosphat die PKA-Aktivität reduziert vorliegt (Peeters et al., 2017). Die PKA steuert nämlich neben dem Metabolismus auch das Zellwachstum und die Proliferation. Die Reduzierung des cAMP-Levels durch die Überexpression des Gens, welches für Phosphodiesterase (*PDE2*) codiert, zeigte ebenfalls einen deutlich verspäteten Zellzykluseintritt (vgl. Abbildung 4-29). Auch dies führt zu einer weniger aktiven PKA, da das gebildete cAMP an die regulatorische Untereinheit bindet, wodurch die Kinase aktiviert wird (Broach, 2012; Busti et al., 2010). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine verminderte PKA-Aktivität in der eIF2-Mutante der Auslöser für einen verspäteten Zellzykluseintritt sein könnte (vgl. Abbildung 5-1).

PP2A und PP1 sind die relevantesten Serin-Threonin-Phosphatasen in eukaryotischen Zellen. Sie sind an einer Vielzahl von wichtigen zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Translation und

Metabolismus beteiligt (Castermans et al., 2012). Beide werden nach Bindung an ihre spezifischen regulatorischen Untereinheiten durch Glukose aktiviert, wobei die Aktivierung von PP1 von der regulatorischen Untereinheit Reg1 abhängig ist. Die Untersuchung der Glukose abhängigen Aktivierung von PP2A ergab nach der *REG1*-Deletion eine Deaktivierung von PP2A. Da in der *cdc123-Δ326*-Mutante weniger Reg1 gefunden werden konnte (vgl. Abbildung 4-21), könnte dies zu verringerten PP2A führen. Die Phosphatase ist auch in der G1/S-Transition beteiligt (Jiang, 2006), was eine Erklärung für die vermehrten G1-Zellen in den eIF2-Mutanten sein könnte. Zudem wurde vermutet, dass die Glukose-Aktivierung der beiden Serin-Threonin-Phosphatasen durch die aktive PKA vermittelt wird. Hierbei wurden die Glukosekinasen (*HXK1/2* und *GLK1*) sowie die katalytischen Untereinheiten von PKA analysiert (Castermans et al., 2012).

Viele dieser Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine eIF2 vermittelte Störung der Translationsinitiation einen veränderten metabolischen Stoffwechsel aufweist, der wiederum zu einem verspäteten Zellzykluseintritt führt. Da die beobachtete Zellzyklusverzögerung in den Mutanten allerdings nur eine Folge der gestörten eIF2-Funktion ist, stellt sich die Frage, ob die anderen Initiationsfaktoren ebenfalls einen veränderten Metabolismus aufweisen. Wenn keine Veränderung festgesellt werden kann, so wären die vermehrten G1-Zellen eine Folge des veränderten Metabolismus, welcher eine Folge der verminderten eIF2-Funktion ist.

5.2 Verstärkter oxidativer Metabolismus

In *S. cerevisiae* ist der favorisierte Stoffwechselweg die Fermentation. Wenn der Zelle Glukose vorliegt, unabhängig von Sauerstoff, wird Ethanol produziert und schnell ATP gewonnen (Otterstedt et al., 2004). Währenddessen liegen die Gene reprimiert vor, die nach dem Verbrauch von Glukose stark exprimiert werden. Diese Gene werden vor allem während des diauxischen Wechsels aktiv abgelesen (Galdieri et al., 2010). Auch in der eIF2-Mutante konnte eine erhöhte Expression dieser Gene festgestellt werden. Neben der verstärkten Expression von atmungsspezifischen und Glukose-reprimierten Genen kann eine erhöhte Snf1-Aktivität in den eIF2-Mutanten angenommen werden (vgl. Abbildung 5-1 B).

5.2.1 Erhöhte Expression atmungsspezifischer Gene in eIF2-Mutanten

Ein entscheidendes Ergebnis in den eIF2-Mutanten war die *GCN4* unabhängige, verstärkte Expression von atmungsspezifischen Genen (vgl. Abbildung 4-13). Eine Untersuchung von mitochondrialen Proteinen während des fermentativen und des nicht fermentativen Wachstums brachte zum Vorschein, dass die größten Veränderungen in den oxidativen Phosphorylierungsproteinen sowie im TCA zu finden waren (Morgenstern et al., 2017). In den eIF2-Mutanten wurde festgestellt, dass eine stärkere Expression von Genen, die für den TCA, die Atmungsketten-Komplexe II-IV sowie der ATP-Synthase (F_1 und F_0) codieren, vorlag (vgl. Abbildung 4-14). Dieses Ergebnis festigt die Vermutung, dass die Translationsinitiationsmutanten einen veränderten Glukosestoffwechsel aufweisen. Für die Expression der atmungsspezifischen Gene, die

für die Atmungsketten-Komplexe und für Enzyme des TCA codieren, ist der HAP-Komplex der entscheidende Regulator (Buschlen et al., 2003). Zu den weiteren Atmung regulierenden Transkriptionsfaktoren gehören Gcr1, Cat8, und der RTG-Komplex, die je nach Bedingungen unterschiedliche Einflüsse haben (Fendt & Sauer, 2010). Interessanterweise lag *HAP4*, welches durch Glukose reprimiert wird, mehr als doppelt so stark in der Mutante vor ($\log_2$ 1,28 in *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). Eine erhöhte Proteinmenge im Western-Blot und in der Mikroskopie konnte in der *cdc123-Δ326*-Mutante allerdings nicht festgestellt werden. Dennoch sahen die Proteinbanden verändert aus. Unerklärlicherweise war in der Glycerin-Probe der Mutante noch weniger Protein als in der Glukose-Probe detektierbar, wohingegen im Wildtyp die entsprechende Proteinmenge in den Glycerin-Proben deutlich zunahm (vgl. Abbildung 4-16).

Zu den zuvor beschriebenen atmungsspezifischen Genen, die durch den HAP-Komplex reguliert werden, gehört auch die Expression von *RTG1* (Reimand et al., 2010). Rtg1 ist ein Teil des retrograden Signalwegs, der von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist. Über diesen Signalweg kann eine Kommunikation zwischen Mitochondrien und Zellkern stattfinden, wobei die Reaktion darauf eine veränderte Genexpression sowie eine metabolische Reprogrammierung sein kann (Trendeleva & Zvyagilskaya, 2018). In der Hefe wird dieser Signalweg durch Rtg1-3 kontrolliert, wobei Rtg1/3 Transkriptionsfaktoren sind und Rtg2 ein Sensor für Fehlfunktionen in den Mitochondrien ist. Rtg1/3 bilden einen heterodimerischen Komplex, welcher seine Lokalisation, je nach Phosphorylierungsstatus, ändert. Die Lokalisation in den Nukleus wird durch Rtg2 induziert. Im Kern können daraufhin Gene exprimiert werden, die für mitochondriale Proteine sowie für die ersten vier Enzyme des TCA-Zyklus codieren (Liu & Butow, 2006; Trendeleva & Zvyagilskaya, 2018). Mithilfe der RNA-Seq-Daten konnte in der *imt2-4Δ*-Mutante eine leicht erhöhte Expression von *RTG1/3* festgestellt werden. ($\log_2$ Veränderung in *imt2-4Δ* im Vergleich zum Wildtyp, *RTG1* 0,9 und *RTG3* 0,5, siehe Anhang 10.1). Die Analyse des RTG-Komplexes in den eIF2-Mutanten wäre aufgrund der *HAP4*-Regulation, sowie der erhöhten Expression der TCA-Gene, deshalb von großem Interesse.

Durch die Inhibierung der Translationsinitiation konnte zusätzlich eine verzweigte und filigrane Mitochondrienstruktur festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-15). Die vernetzte und aufwendige Mitochondrienstruktur wurde in Zellen, die mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle wachsen, ebenfalls beobachtet (Egner et al., 2002). Genau in diesen Zellen, vor allem jedoch in denen, die Glukose aufgebraucht haben, wird *HAP4* verstärkt exprimiert (DeRisi et al., 1997; Fendt & Sauer, 2010). In dieser Arbeit konnte zusätzlich festgestellt werden, dass eine Überexpression von *HAP4* im Wildtyp zu den gleichen verzweigten Strukturen wie in der *cdc123-Δ326*-Mutante führte (Anhang Abbildung 10-5). Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor schon beschrieben (Lascaris et al., 2003). Die Tatsache, dass die *HAP4*-Deletion zu einer Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps der Mitochondrienstruktur in der Mutante führte, machte Hap4 für weitere Analysen zu einem interessanten Kandidaten (vgl. Abbildung 4-15). Die Beobachtungen

der Mitochondrienstruktur in den unterschiedlichen Mutanten lassen den Schluss zu, dass Hap4 direkt oder indirekt in der *cdc123-Δ326*-Mutante zur veränderten mitochondrialen Morphologie beiträgt.

Neben der verzweigten Mitochondrienstruktur führt eine *HAP4*-Überexpression in Glukose gewachsenen Zellen, zu einer teilweisen Derepression der atmungsspezifischen Gene (Blom et al., 2000; Lascaris et al., 2003). Die Zellen mit überexprimierten *HAP4* wurden beschrieben, als würden diese einen physiologische diauxische Wechsel durchlaufen. Dies konnte ebenfalls in den eIF2-Mutanten beobachtet werden. Eine Vermutung, warum in den eIF2-Mutanten Hap4 verändert vorliegen könnte, ist der 5'-*Leader*. Neben den 2 uORFs konnte eine IRES in der Region gefunden werden (Bolotin-Fukuhara, 2017; Ingolia et al., 2009; Nagalakshmi et al., 2008; Seino et al., 2005). Die von AUG zu ATG mutierten uORFs, führten nicht zu einer forcierten Translation des Reporters (vgl. Abbildung 4-16). Zellen mit Glukosemangel zeigten jedoch eine verstärkte; IRES abhängige *HAP4*-Translation, wohingegen die Cap abhängige Translation ineffizient vorlag (Seino et al., 2005). Damit sichergestellt werden kann, dass *HAP4* in den eIF2-Mutanten nicht translational reguliert wird, müsste die IRES in den Mutanten untersucht werden.

Wie schon zuvor erwähnt, konnte eine mehr als doppelt so hohe *HAP4*-Transkriptmenge in den eIF2-Mutanten detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *HAP4*-Expression von Kohlenstoffquellen abhängig ist. So wurde 1000 bp vor der Startsequenz eine 265 bp lange aktivierende Region mit einer CSRE („*carbon source-responsive element*“ Kohlenstoffquellen reagierendes Element) ähnlichen Sequenz identifiziert. In einem Reporter-Assay wurde eine verstärkte Expression dieser Region in Medium mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle detektiert (Brons et al., 2002). Interessanterweise war diese starke Expression von *CAT8* abhängig. Cat8 ist ein Transkriptionsaktivator, der essenziell für die Derepression von Genen ist, die in der Gluconeogenese involviert sind (Bojunga & Entian, 1999). Genau diese Gene werden in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert (vgl. Abbildung 4-24). Die Expression wird durch die CSRE-Sequenz im Promotor vermittelt, welche auch in ähnlicher Form im *HAP4*-Promotor gefunden werden konnte (Brons et al., 2002). Damit getestet werden kann, ob die verstärkte *HAP4*-Expression in den eIF2-Mutanten Cat8 abhängig ist, sollten hier weitere Analysen durchgeführt werden. In den anderen Genen, die für die Untereinheiten des HAP-Komplexes (2/3/5) codieren, war wie zu erwarten, keine veränderte Transkriptmenge zwischen den Genotypen feststellbar. In den Bindekomponenten liegt eine konstitutive Expression vor, sie werden demnach nicht durch eine Kohlenstoffquelle beeinflusst (Bolotin-Fukuhara, 2017). Zusätzlich zu der aktivierenden Region von Hap4 wurde *in vitro* eine Mig1-Bindestelle 350 Basen vor der Startsequenz gefunden (Lundin et al., 1994). *In vivo* konnte jedoch keine funktionsfähige Mig1-Bindungsstelle nachgewiesen werden. Untersuchungen ergaben, dass die Deletion von Mig1 nicht zur erhöhten *HAP4*-Expression in Glukose führte. Jedoch sind spezifische Faktoren unter

diesen Bedingungen inaktiv oder fehlen. Aus diesem Grund kann eine durch Mig1 vermittelte Regulation nicht ausgeschlossen werden (Brons et al., 2002; Klein et al., 1999).

5.2.2 Hyperaktives Snf1 in eIF2-Mutanten

Die Glukose-reprimierten Gene wurden in den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert (vgl. Abbildung 4-17). Hierbei spielt der Snf1-Mig1-Repressionssignalweg eine wichtige Rolle (Busti et al., 2010; Rolland et al., 2002). Während des fermentativen Wachstums ist der Komplex Tup1-Cyc8 und Mig1 für die Repression der respiratorischen, gluconeogenen sowie der Gene für die Nutzung von alternativen Kohlenstoffquellen verantwortlich (Keleher et al., 1992; Tzamarias & Struhl, 1994). Der Tup1-Cyc8-Komplex bindet hierbei nicht direkt an die DNA, sondern wird durch eine physikalische Interaktion mit dem DNA-Bindeprotein (hier Mig1) zu den Promotoren rekrutiert. Mig1 ist ein wichtiger Repressor der an Promotoren Glukose-reprimierten Gene bindet (Treitel & Carlson, 1995). Während des fermentativen Wachstums liegt Mig1 im Nukleus vor, wird nach Glukosemangel phosphoryliert und aus dem Kern exportiert. Die Gene, die für Enzyme codieren, die andere Kohlenstoffquellen verwerten können, werden daraufhin exprimiert. In den eIF2-Mutanten konnte eine verminderte Menge im Nukleus detektiert werden (vgl. Abbildung 4-18). Es war zwar geringfügig weniger Protein nachweisbar, weshalb sich die deutliche Abnahme des Kern-lokaliserten Mig1-Signals nur bedingt erklären lässt (in der Mutante 83% Mig1 Gesamtproteinmenge, 55% Mig1 im Kern lokalisiert, im Vergleich zum Wildtyp 100%). Aber auch die verminderte Mig1-Menge, obwohl deutlich mehr *MIG1* in den Mutanten exprimiert wird (log2 Veränderung 0,71 in *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1), deutet auf eine Derepression der Glukose-reprimierten Gene hin. Die mittlere Länge der 5'-*Leader* in der Hefe beträgt 95,5 Basen $\pm$ 116,8 Basen und mit 116 Basen liegt der von Mig1 genau in diesem Bereich (Lin & Li, 2012; Nagalakshmi, et al., 2008). Die schlechtere Translation von *MIG1*, entweder aufgrund der Initiationsstörung oder gegebenenfalls wegen einer höheren Proteininstabilität, könnte für die verstärkte Expression der Glukose-reprimierten Gene mit verantwortlich sein. Mig1 trägt jedoch nicht zu einem veränderten Zellzyklus bei, da nach der Deletion des Repressors vergleichbar viele G1-Zellen wie im Wildtyp detektiert werden konnten (vgl. Abbildung 4-19).

Der Kern Import und Export von Mig1 ist essenziell für die Repression oder Derepression der relevanten Gene. In einer Studie wurde beschrieben, dass ein Mig1-Import nach Glukose-Zugabe innerhalb von wenigen Minuten stattgefunden hat. Genauso schnell konnte ein Export durch Glukosemangel festgestellt werden (Devit et al., 1997). In der *cdc123-Δ326*-Mutante wurde der Glukose abhängige Mig1-Import analysiert, um sicherzugehen, dass das Pendeln nicht der Auslöser für die Derepression der Gene ist. Anhand der Zeitaufnahmen konnte jedoch kein verändertes Mig1-Importverhalten in der *cdc123-Δ326*-Mutante festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-18). Neben dem glukoseabhängigen Nukleus-Import und Export konnte zusätzlich unter konstanten Bedingungen pulsartiges Pendeln zwischen Kern und Cytoplasma beo-

bachtet werden (Dalal et al., 2014; Lin et al., 2015). Für einen kontinuierlichen Kern-Cytoplasma-Shuttle von Mig1, unter Glukose-Bedingungen, ist Hxk2 notwendig (Schmidt et al., 2020). Schon 1984 wurde über die regulatorische Funktion von Hxk2 in der Glukose-Repression berichtet (Entian & Frohlich, 1984). Es konnte eine direkte Interaktion zwischen Mig1 und Hxk2 detektiert werden (Ahuatzi et al., 2004). Das Serin 311 von Mig1 spielt eine wichtige Rolle für die durch Glukose-regulierte Interaktion mit Hxk2. Die Snf1-Kinase interagiert unabhängig von der Glukosekonzentration mit der Hxk2-Komponente des Repressorkomplexes Mig1-Hxk2. Wenn Glukose verbraucht ist, bindet Snf1 an Mig1 und phosphoryliert das Serin 311, was wiederum zum Export von Mig1 und zur Derepression der Gene führt. Die Vermutung liegt nahe, dass Hxk2 durch Inhibierung der Mig1-Phosphorylierung bei vorhandener Glukose in der Glukose-Repression mitwirkt (Ahuatzi et al., 2007). Die Daten von Schmidt und Kollegen deuten darauf hin, dass der Kernimport zunächst über Signale aus dem Metabolismus reguliert wird. Der kontinuierliche Shuttle, der vermutlich für die Glukose-Repression notwendig ist, wird dann über die Hexokinase reguliert (Schmidt et al., 2020). In den eIF2-Mutanten konnte weniger Transkript ($\log_2 HXK2$ in *cdc123-Δ326* -0,79 im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1) sowie eine geringere Hxk2-Menge detektiert werden (vgl. Abbildung 4-25). So könnte die verminderte Glukose-Repression eine Folge des geringeren Hxk2-Levels sein. Da weniger Hxk2 in den Zellen vorliegt, wird Mig1 stärker phosphoryliert und aus dem Kern exportiert (vgl. Abbildung 5-1). Hier stellt sich die Frage, ob die Mig1-Kernlokalisierung durch eine erhöhte Expression von *HXK2* in *cdc123-Δ326* auf das wildtypische Niveau gebracht werden kann.

Eine weitere Vermutung über das geringere Mig1-Level im Nukleus kann an der erhöhten Snf1-Aktivität liegen. Die erhöhte Aktivität zusammen mit der verminderten Hxk2-Menge könnten einen Einfluss auf die Derepression der besagten Gene haben (vgl. Abbildung 5-1). Die Verminderung der Snf1-Aktivität führt zu einer Kernlokalisierung von Mig1, auch wenn nur wenig Glukose vorhanden ist. Dies bestätigt die Notwendigkeit von Snf1 für den Export von Mig1 (Shashkova et al., 2017). Vergleichbare Daten konnten auch in der *cdc123-Δ326*-Mutanten gesehen werden. Hier führte die Deletion der Kinase zu einer erhöhten Mig1-Anreicherung im Nukleus (vgl. Abbildung 4-20). Dieses Ergebnis deutet auf eine verstärkte Snf1-Aktivität hin, die zu einem erhöhten Mig1-Export führt.

Die Kinase Snf1, eine AMP-Serin-Threonin-Kinase, ist am Repressionssignalweg und auch an weiteren zellulären Entwicklungsprozessen beteiligt (Hedbacker & Carlson, 2009). Der Snf1-Komplex ist heterotrimerisch, wobei die katalytische α -Untereinheit Snf1 für das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen notwendig ist (Cocchetti et al., 2018). Die β -Untereinheiten Gal83 spielt in der Snf1-abhängigen Transkriptionsregulation während des Glukosemangels eine wichtige Rolle. Damit die Kinase aktiv vorliegt, muss Snf1 an der Stelle T210 durch seine „upstream“-Kinasen phosphoryliert werden (Castermans et al., 2012; McCartney & Schmidt, 2001). Durch die Mutagenisierung dieser Stelle kann keine Anreicherung des phosphorylierten Snf1 nach Glukosemangel festgestellt werden.

Neben der Lokalisation von Mig1 reguliert Snf1 auch die Aktivität von Cat8 (Coccetti et al., 2018). Durch die Inaktivierung des Transkriptionsaktivators erfolgte eine erhöhte Expression der Gene, die für Enzyme der Gluconeogenese codieren. Dies würde ebenfalls für eine Hyperaktivierung von Snf1 in den eIF2-Mutanten sprechen, da gleiche Gene in der Mutante verstärkt exprimiert werden (vgl. Abbildung 4-24). Liegt ein Mangel an Glukose vor, phosphoryliert Snf1 außerdem die Fructose-2,6-bisphosphatase (Pfk27), was zu einem SCF^{Grr1} vermittelten Abbau des glykolytischen Enzyms führt (Coccetti et al., 2018). Durch Fructose-2,6-Bisphosphat wird Phosphofruktokinase (Pfk1/2) aktiviert (Nissler et al., 1983; Xu et al., 2012). Eine Hyperaktivierung von Snf1 führt somit zu weniger Fructose-2,6-Bisphosphat, was einen verminderten glykolytischen Fluss der eIF2-Mutante erklären könnte (Abbildung 5-1). Zusätzlich wurde eine erhöhte Snf1-Aktivität in Zellen gefunden, die eine verminderte PKA-Aktivität aufwiesen (Barrett et al., 2012). Auch in den eIF2-Mutanten lag eine geringere PKA-Aktivität vor (vgl. Abbildung 4-30). Es konnte gezeigt werden, dass beide Kinasen (Snf1, PKA) die gleichen Transkriptionsfaktoren regulieren (Coccetti et al., 2018). Zum Beispiel wird in Anwesenheit von Glukose Adr1, ein Transkriptionsaktivator von Glukose-reprimierten Genen, durch PKA inaktiv gehalten. Nachdem Glukose aufgebraucht wurde, wird Adr1 durch die Phosphorylierung von Snf1 aktiviert. Es wurde zudem beschrieben, das aktives Snf1 die Adenylatcyclase phosphoryliert (Coccetti et al., 2018). Dies führt zu einem niedrigeren cAMP-Level, gefolgt von weniger aktiver PKA. Eine Hyperaktivierung von Snf1 in den eIF2-Mutanten, würde somit auch die verringerte PKA-Aktivität erklären (vgl. Abbildung 4-30, 5-1). Zusammengefasst sprechen diese Daten für eine erhöhte Snf1-Aktivität in den Translationsinitiationsmutanten.

Wie genau es zu einer erhöhten Snf1-Aktivität in den eIF2-Mutanten kommt, ist jedoch auf molekularer Sicht noch offen. So wäre eine erhöhte Snf1-Aktivität als Folge der geringeren Reg1-Menge, denkbar. Die Phosphatase Glc7-Reg1 ist für die Glukose abhängige Dephosphorylierung und damit für die Inaktivierung von Snf1 verantwortlich (Rubenstein et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Reg1 für die Glukose-Repression notwendig ist (Zhang et al., 2011). Mutationen in der regulatorischen Untereinheit der PP1 führen zu einer Hyperaktivierung von Snf1. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch die Deletion von *REG1* keine Dephosphorylierung von Snf1 in Anwesenheit Glukose detektierbar war (Castermans et al., 2012). Außerdem wuchsen die Zellen nach der Deletion schlechter (Barrett et al., 2012). In der eIF2-Mutante wurde etwa 40% weniger Reg1 im Western-Blot detektiert (vgl. Abbildung 4-21). Diese Daten passen zu der getroffenen Vermutung, dass die verminderte Reg1-Menge in den eIF2-Mutanten zu einer verstärkten Snf1-Phosphorylierung und zur damit verbundenen Aktivitätssteigerung führt (vgl. Abbildung 5-1). In der *cdc123-Δ326*-Mutante konnte eine leicht erhöhte *REG1*-Menge festgestellt werden (log2 Veränderung 0,33 in *cdc123-Δ326* im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). Der lange 5'-Leader von *REG1* (318 Basen) könnte die schlechte Translationsinitiation erklären (Heyer & Moore, 2016; Nagalakshmi et al., 2008). Jedoch war es nicht möglich, durch einen Austausch des 5'-Leaders mit dem *pTEF2*-Promotor,

mehr Protein zu erhalten. Diese Daten sprechen dafür, dass Reg1 instabil in der *cdc123-Δ326*-Mutante vorliegt. Um einen direkten Einfluss der *REG1*-Translation bzw. Stabilität auf den Metabolismus und auf den Zellzyklus zu bekommen, müssen hier noch weitere Analysen durchgeführt werden.

Shashkova und Kollegen zeigten, dass Reg1 auch eine Rolle in der Mig1-Dephosphorylierung unter Glukose-Bedingungen spielt. Die Deletion von *REG1* beeinflusst jedoch nicht den Mig1-Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit der Glukosekonzentration (Shashkova et al., 2017). Da in der *cdc123-Δ326*-Mutante ebenfalls keine veränderte Mig1-Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp sichtbar war, wäre eine erhöhte Snf1-Aktivität durch zu wenig Reg1 vorstellbar (vgl. Abbildung 4-18). Andere zusätzliche Glc7-Reg1 unabhängige Dephosphorylierungs-Mechanismen werden außerdem noch angenommen (Shashkova et al., 2017).

Snf1 wurde eine weitere Rolle zugestanden. So konnten Cherkasova und Kollegen ermitteln, dass während des Aminosäure- und Glukosemangels, Snf1 einen Einfluss auf die eIF2 α -Phosphorylierung hat. Nachdem Glukose verbraucht wurde, inhibiert Snf1 die eIF2 α -Phosphatase und ermöglicht damit den Erhalt der inaktiven eIF2B assoziierten Form (vgl. Abbildung 3-12, Cherkasova et al., 2010). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden eIF2 α -Phosphorylierungen näher untersucht. In der *cdc123-Δ327*-Mutante konnte nach Aminosäuremangel eine stärkere Phosphorylierung von eIF2 α im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Perzlmaier, 2011). Dies könnte an der erhöhten Snf1-Aktivität oder vielmehr an dem verminderten Reg1-Level in der Mutante liegen. Unter Normalbedingungen, wenn alle Nährstoffe verfügbar sind, konnte jedoch in der Mutante keine verstärkte Phosphorylierung von eIF2 α festgestellt werden (Perzlmaier, 2011). Interessanterweise wurde das gleiche Ergebnis mit der Deletion von *REG1* detektiert (Cherkasova et al., 2010). Durch *reg1Δ* liegt Snf1 aktiviert vor, jedoch kann nur eine verstärkte eIF2 α -Phosphorylierung nach Aminosäuremangel gefunden werden. Es stellt sich zudem die Frage, ob die Translationsstörung in die andere Richtung agieren kann. Sie könnte Auslöser für eine erhöhte Snf1-Aktivität sein, indem die *REG1*-Translation inhibiert wird. Hier wäre interessant zu untersuchen, ob die eIF2 α Phosphorylierung in der Doppelmutante *cdc123-Δ326 snf1Δ* eine ähnlich starke eIF2 α -Phosphorylierung wie der Wildtyp aufzeigt. Wenn dies so wäre, könnte die verstärkte Snf1-Aktivität in der Mutante bestätigt und die daraus erhöhte resultierende eIF2 α -Phosphorylierung erklärt werden.

In der eIF2-Mutante konnten eine Reihe von verschiedenen Faktoren ermittelt werden, die für eine zumindest teilweise verminderte Glukose-Repression sprechen. Es kann festgehalten werden, dass durch die Störung der Translationsinitiation Snf1 aktiver vorliegt. Die Hyperaktivierung von Snf1 kann durch verminderte Reg1-Menge erklärt werden (vgl. Abbildung 5-1). Ein genauer molekularer Mechanismus muss jedoch noch gefunden werden. Eine Folge der verminderten Reg1-Menge und des hyperaktiven Snf1 ist ein veränderter Metabolismus sowie ein langsamer Zellzykluseintritt.

5.3 Glykolytischer Fluss in eIF2-Mutanten reduziert

In den eIF2-Mutanten kann ein verminderter glykolytischer Fluss angenommen werden. Eine Schlüsselkomponente ist erneut die Hexokinase 2. Die verminderte Menge spielt nicht nur in der Repression von Genen eine wichtige Rolle, sondern sie ist auch das Schlüsselenzym in der Glykolyse (Rodríguez et al., 2001). Ist in den Zellen Glukose verfügbar, so wird *HXK2* am stärksten abgelesen, wohingegen die anderen Kinasen *HXK1* und *GLK1* inhibiert vorliegen. Diese werden erst nachdem Glukose aufgebraucht ist, verstärkt in den Zellen exprimiert. Die Transkriptionsdaten der eIF2-Mutanten bestätigen eine ähnliche Situation. *HXK2* liegt reprimiert und die beiden anderen Gene verstärkt exprimiert vor (vgl. Abbildung 4-24). Auch hier spielt die durch Hxk2 vermittelte Glukose-Repression eine Rolle, da dieses Protein an der Unterdrückung der beiden anderen Kinasen beteiligt ist (Rodríguez et al., 2001).

Die Hexokinase wird durch Trehalose-6-Phosphat inhibiert, ein Zwischenprodukt der Trehalose-Synthese (Blázquez et al., 1993). Trehalose ist ein Speicherstoff, der während Hungerperioden, zum Beispiel während des diauxischen Wechsels, akkumuliert (Lillie & Pringle, 1980). Läuft dieser Zwischenweg nicht ab, kommt es zu einem unkontrollierten Zufluss von Glukose, da die Hxk2 aufgrund der Deletion nicht mehr von *TPS1* inhibiert werden kann (Aelst et al., 1993; Peeters et al., 2017). Erst wenn beide Enzyme nicht funktionsfähig sind und dadurch der glykolytische Fluss vermindert wird, sind die Zellen lebensfähig (vgl. Abbildung 4-26; Hohmann et al., 1993). Bemerkenswerterweise kann die *cdc123-Δ326*-Mutante trotz der Deletion von *TPS1* auf Glukose wachsen (vgl. Abbildung 4-26). Dies deutet auf einen verminderten glykolytischen Fluss in der eIF2-Mutante hin (vgl. Abbildung 5-1). Vermutlich ist eine Anhäufung der Glykolyse-Metabolite trotz der *TPS1*-Deletion geringer, zumindest geringer als im Wildtyp, der nicht lebensfähig ist. Außerdem kann angenommen werden, dass die Hxk2 in der *cdc123-Δ326*-Mutante zusätzlich durch Trehalose-6-Phosphat inhibiert wird. Es kann nämlich in den *cdc123-Δ326 tps1Δ*-Zellen ein vermindertes Wachstum auf Glukose detektiert werden. Dieses Wachstumsdefizit wird womöglich durch eine erhöhte Anreicherung der Metabolite ausgelöst. So liegt zwar weniger Hxk2 in der eIF2-Mutante vor, was ein Wachstum der Doppelmutanten (*cdc123-Δ326 tps1Δ*) ermöglicht, jedoch noch zu viel, um das vorherige Wachstum der eIF2-Mutante wiederherzustellen zu können. Zudem wurde zuvor berichtet, dass Trehalose-6-Phosphat als Sensormolekül agiert und die Fermentation fördert (Vicente et al., 2018). In der Studie wurde gezeigt, dass beim Verlust der Tps1-Funktion die Prozessierung von Glukose zu Ethanol so gut wie komplett verloren geht. Durch die Zugabe von Trehalose-6-Phosphat konnte die Fermentationskapazität erheblich gesteigert werden. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Trehalose-6-Phosphat für die Repression der Gene, die für die Enzyme der Gluconeogenese codieren, notwendig ist (Vicente et al., 2018). Es könnte demnach sein, dass durch die verringerte Hxk2-Menge weniger Trehalose-6-Phosphat gebildet werden kann, da die Glukose für die Synthese von Pyruvat genutzt wird (vgl. Abbildung 5-1). Außerdem werden genau die Gene in

den eIF2-Mutanten verstärkt exprimiert, die für die Enzyme der Gluconeogenese codieren (vgl. Abbildung 4-24).

Während der exponentiellen Phase degradiert die Hefe das Disaccharid durch die neutrale Trehalase Nth1, die in dieser Phase die höchste Aktivität besitzt. Interessanterweise konnte die verstärkte Expression des codierenden Gens während des diauxischen Wechsels detektiert werden, dann, wenn das Enzym inaktiv vorliegt (Eleutherio et al., 2015; Thevelein, 1984; Zahringer et al., 2000). In den eIF2-Mutanten kann eine fast doppelt so hohe *NTH1*-Expression festgestellt werden ($\log_2$ von *NTH1* in *cdc123-Δ326* 0,81 im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). Dies bestätigt erneut die Annahme, dass sich die Zellen verhalten, als ob sie keine Glukose zur Verfügung hätten. Die Expression von *NTH1* wird durch die Transkriptionsfaktoren Msn2/4 induziert (Zahringer et al., 2000). Beide Faktoren sind für die Expression von über 30 Genen während des diauxischen Wechsels verantwortlich (Boy-Marcotte et al., 1998). Genau dieselben Gene, die auch verstärkt in den eIF2-Mutanten exprimiert vorlagen (vgl. Abbildung 4-17, siehe Anhang 10.1). Die Lokalisation von Msn2/4 ist PKA abhängig, so liegen sie bei geringer Aktivität dephosphoryliert vor und werden daraufhin in den Kern importiert (De Wever et al., 2005; Görner et al., 1998). In den eIF2-Mutanten konnte eine verminderte PKA-Aktivität festgestellt werden (vgl. Abbildung 4-30). Die Lokalisation beider Transkriptionsfaktoren wurde untersucht und ergab in der *cdc123-Δ326*-Mutante keine verstärkte Kernlokalisation im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde mehrfach eine durch Snf1 vermittelte Phosphorylierung beider Transkriptionsfaktoren und eine damit verbundene Cytoplasma-Lokalisation beschrieben (De Wever et al., 2005; Lee et al., 2008; Morrissette & Rolfes, 2020). Dies würde erneut die verstärkte Snf1-Aktivität in den eIF2-Mutanten bestätigen, bedeutet jedoch auch, dass Msn2/4 nicht gut für Lokalisationsuntersuchungen geeignet ist. Die enzymatische Aktivität von Nth1 wird durch Phosphorylierung von PKA vermittelt und durch die Bindung an das 14-3-3 Protein verstärkt (Schepers et al., 2012; Veisova et al., 2012). In den eIF2-Mutanten kann damit eine gehemmte katalytische Fähigkeit von Nth1 angenommen werden, die im Wildtyp erst während des diauxischen Wechsels auftritt. Denkbar wäre, dass in den eIF2-Mutanten, die nicht degradierte Trehalose aus der Zelle exportiert und dort durch die saure Trehalase, Ath1 abgebaut wird. Der Transporter (Mal11) wird, wenn Glukose verfügbar vorliegt, eventuell von Mig1 reprimiert (Vidgren et al., 2011). Auch Ath1 wurde verstärkt in Zellen gefunden, in denen keine Glukose mehr vorlag (Garre et al., 2009). Die beiden Gene *ATH1* und *MAL11* liegen in den eIF2-Mutanten stärker exprimiert vor ($\log_2$ in *cdc123-Δ326* von *ATH1* 0,44 und *MAL11* 0,51 im Vergleich zum Wildtyp, siehe Anhang 10.1). Um diese Annahme zu bestätigen, wäre die Messung der Trehalose-Konzentration ein wichtiger Aspekt.

Der verminderte glykolytische Fluss ist vermutlich eine Folge von zu wenig Hxk2 und führt zu weniger Fruktose-1,6-Bisphosphat. Jedoch kann auch, wie schon zuvor beschrieben eine erhöhte Snf1-Aktivität zu weniger Fruktose-1,6-Bisphosphat führen (Abbau Pfk27 vgl. 5.2.2, Abbildung 5-1). Die Katalyse von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat wird von der

Pfk1/2 umgesetzt, ein entscheidender Schritt der Glykolyse. Durch den Metabolit wird Ras über seinen GEF-Faktor Cdc25 aktiviert, vermehrt cAMP synthetisiert und die PKA-Aktivität gesteigert (Peeters et al., 2017). Erstaunlicherweise konnten Peeters und Kollegen berichten, dass ein verstärkter glykolytischer Fluss die Ras-Aktivität deutlich erhöhte (Peeters et al., 2017). In der Hefe kann ein starker Zusammenhang zwischen schneller Zellproliferation und glykolytischer Aktivität hergestellt werden (Peeters et al., 2017). Zudem führt ein stark reduzierter glykolytischer Fluss zu einer teilweisen Aufhebung der durch Glukose-vermittelten Genrepression (Elbing et al., 2004; Gancedo, 2008). Die verstärkte Zellproliferation, die durch Ras erhöhte PKA-Aktivität und die Glukose-induzierte Repression von Genen im Wildtyp, bestätigen erneut einen verminderten glykolytischen Fluss in den eIF2-Mutanten. Bemerkenswert war der fast wildtypische Zellzyklus der *cdc123-Δj326*-Mutante, als Folge vom dauerhaft aktiven Ras (vgl. Abbildung 4-28).

Wie genau dieser verminderte glykolytische Fluss in den eIF2-Mutanten zustande kommt ist jedoch noch unklar. Neben der verminderten Hxk2-Menge könnte eine mögliche Überproduktion von Trehalose zur Aufrechterhaltung des Speicherstoffs in den Zellen, Auslöser für den verminderten glykolytischen Fluss sein. So konnte in einer Metabolom-Studie eine Anreicherung von Trehalose und cAMP in einer inaktiven PKA-Mutante detektiert werden (Xu et al., 2012). Es ist zudem gut denkbar, dass sowohl die reduzierte Hxk2-Menge als auch die erhöhte Snf1-Aktivität für den verminderten glykolytischen Fluss verantwortlich sind (vgl. Abbildung 5-1).

Der letzte Schritt der Glykolyse wird durch die Pyruvatkinase katalysiert, wobei Cdc19 als Schlüsselenzym für das fermentative Wachstum essenziell ist (Boles et al., 1997). Das Enzym wird durch die PKA vermittelte Phosphorylierung und allosterische Veränderungen, durch Bindung von Fruktose-1,6-Bisphosphat, reguliert (Jurica et al., 1998; Portela et al., 2002; Xu et al., 2012). Während der Gluconeogenese liegt Cdc19 inaktiv vor und in Abwesenheit von Glukose kommt es zur Akkumulation von Phosphoenolpyruvat, das Substrat von Cdc19 (Cortassa et al., 1995; Xu et al., 2012). Mithilfe der Mikroskopiedaten war es möglich, im Wildtyp unter normalen Wachstumsbedingungen Cdc19-GFP-Kondensate zu detektieren. In der Literatur wurden solche Kondensate nur im Zusammenhang mit Sauerstoffmangel beschrieben (Jin et al., 2017). Unter diesen Bedingungen wird verstärkt Glykolyse betrieben. Zusätzlich konnten unter Stressbindungen Aggregate detektiert werden und auch nur, wenn Cdc19 als Monomer vorlag (Cereghetti et al., 2018; Saad et al., 2017). Diese Aggregate waren jedoch kleiner und kamen vermehrt in den Zellen vor, wohingegen das in dieser Arbeit markierte Cdc19 ein einzelnes großes Kondensat war, welches in fast jeder Mutterzelle gefunden werden konnte (vgl. Abbildung 4-36). So könnte das Kondensat als eine Art Indikator für die Cdc19-Aktivität fungieren. In Zellen, die mit schlecht fermentierbaren Kohlenstoffquellen oder mit geringer Glukosekonzentration gewachsen sind, konnten keine Kondensate gefunden werden (vgl. Abbildung 4-36). Die Cdc19-Aktivität ist nicht von der PKA-Phosphorylierung abhängig, auch bei inaktiver PKA

akkumulierte das Substrat von Cdc19 nicht (Xu et al., 2012). Aus den Mikroskopiedaten konnten nach der *PDE2*-Überexpression weniger Cdc19-GFP-Kondensate detektiert werden, jedoch deutlich mehr als nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle (vgl. Abbildung 4-34, 4-36). So könnte der Einfluss von *pTEF2-PDE2* auf die Cdc19-GFP-Kondensatbildung unabhängig von der PKA-Aktivität sein. Zudem wurde aus der gleichen Studie ersichtlich, dass die Phosphorylierung nicht für die Cdc19-Aktivität notwendig ist (Xu et al., 2012). Durch die Mutagenisierung der PKA-Phosphorylierungsstellen von Cdc19 (S22A) war es möglich, die gleiche Anzahl an Kondensaten wie im Wildtyp zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Auch hier kann der Eindruck gewonnen werden, dass die sichtbaren Kondensate ein Indikator für die Aktivität von Cdc19 sind. Massenspektrometrie-Daten von Xu und Kollegen ergaben, dass Cdc19 durch Fruktose-1,6-Bisphosphat kooperativ aktiviert wird (Xu et al., 2012). Dies bedeutet, dass durch einen geringeren glykolytischen Fluss weniger Fruktose-1,6-Bisphosphat gebildet wird, was zu einer verringerten Cdc19-Aktivität führt. Durch die Deletion von *HXK2* und *PFK2* wird weniger Fruktose-1,6-Bisphosphat gebildet, folglich ist die Aktivität der Pyruvatkinase geringer. So konnten kaum Cdc19-GFP-Kondensate in diesen Mutanten wie auch in der *cdc123-Δ326*-Mutante detektiert werden (vgl. Abbildung 4-31, 4-35). Auch durch die Deletion von *REG1* kam es zu einem Verlust der Cdc19-GFP-Kondensate (Abbildung 4-33). Der glykolytische Fluss ist in dieser Mutante durch die erhöhte Snf1 Aktivität verringert. Vermutlich eine ähnliche Situation wie in der *cdc123-Δ326*-Mutante (vgl. Abbildung 5-1). Diese Daten bestätigt zum einen, dass die Cdc19-GFP-Kondensate Hinweise auf die Aktivität des Enzyms geben können und zum anderen zeigen die Kondensate auch den verringerten glykolytischen Fluss in der *cdc123-Δ326*-Mutante an. Am erstaunlichsten war jedoch, dass durch die Deletion von *HAP4* die Cdc19-Aktivität in einer schlecht fermentierbaren Kohlenstoffquelle vermutlich erhöht wird (vgl. Abbildung 4-37). Eine Annahme wäre, dass durch *hap4Δ* die Zellen nicht mehr respirieren können und dadurch der glykolytische Fluss induziert wird. Schon zuvor konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von *HAP4* eine signifikante Veränderung des Kohlenstoffmetabolismus hervorruft (Blom et al., 2000). So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Hap4 in unterschiedlichen Prozessen (Respiration, mitochondriale Struktur und Cdc19-Aktivität) eine wichtige Rolle spielt und dass in den eIF2-Mutanten, Hap4 und Snf1 eventuell mitverantwortlich für die metabolische Umprogrammierung sind.

In Tumorzellen wurde eine verminderte Aktivität der Pyruvatkinase detektiert, um den Bedarf von biosynthetischen Prozessen zu decken (siehe. 5.4; Van Niekerk & Engelbrecht, 2018). So wäre es möglich, dass das Cdc19-GFP-Kondensat nicht das aktive Tetramer ist, sondern Cdc19 in der inaktiven mono- oder dimeren Form vorliegt und die Kondensate bildet. Unter dieser Annahme würden im Wildtyp andere anabole Prozesse, zur Deckung des Bedarfs an Nebenprodukten, stärker ablaufen. In den eIF2-Mutanten liegt die Translation gehemmt vor, der Bedarf an Aminosäuren ist demnach geringer. Zudem teilen sich die Zellen seltener. Hier wäre es denkbar, dass Cdc19 komplett aktiv vorliegt, um Pyruvat für den respiratorischen Metabolismus

bereit stellen zu können. Hier könnte weiter spekuliert werden, dass in den Mutanten keine Mono- oder Dimere von Cdc19 vorliegen und deshalb keine Kondensate detektierbar waren.

5.4 Warburg-Effekt – Der veränderte Metabolismus im Tumor

Wie schon 1956 von Otto Warburg beschrieben, benutzen die meisten Tumorzellen die Glykolyse, um Energie zu gewinnen (Warburg, 1956). Es wird mehr Glukose aufgenommen, Lactat produziert, ohne dass mehr Sauerstoff verbraucht wird (Crabtree, 1929; Diaz-Ruiz et al., 2009). Hefezellen bevorzugen ebenfalls, unter aeroben Bedingungen, die Fermentation und eignen sich deshalb für den Vergleich mit Tumorzellen. Die metabolische Veränderung der Tumorzelle bringt vermutlich einige Vorteile mit sich (Gatenby & Gillies, 2004). Da die Glykolyse in den Tumorzellen hochreguliert wird, erfolgt durch Bildung von Lactat eine Ansäuerung der Zellen. Die Tumorzellen müssen sich dementsprechend anpassen, um resistent gegen die säureinduzierte Zelltoxizität zu sein. Diese Anpassung führt zu einem starken Wachstumsvorteil gegenüber physiologischen Zellen sowie einer ungehemmten Proliferation. Der molekulare Mechanismus, wie es zu dem Warburg-Effekt in den Tumorzellen kommt, ist noch nicht bekannt. Jedoch wird angenommen, dass bestimmte glykolytische Enzyme sowie Glukose-Transporter hochreguliert werden. Atmungsspezifische Gene werden hingegen inhibiert (Diaz-Ruiz et al., 2009; Warburg, 1956).

Durch den Vergleich von Tumorzellen mit Hefezellen konnten beim Energiestoffwechsel viele Gemeinsamkeiten gefunden werden. Damit die Energieproduktion den Bedarf der Zelle decken kann, muss viel Glukose aufgenommen und schnell verarbeitet werden (Crabtree, 1929; Thevelein, 1984). Liegt in den Tumor- und Hefezellen eine hohe Glukosekonzentration vor, werden die Gene, die für die glykolytischen Enzyme codieren, verstärkt exprimiert und aktiviert, um den fermentativen Fluss zu erhöhen (Diaz-Ruiz et al., 2009). Sowohl in der Hefe als auch in einigen Tumorzellen konnte eine Überexpression der drei Schlüsselenzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase gefunden werden (Feng et al., 2020).

Im Brustkrebs beispielsweise ist die verstärkte Aktivität von Hexokinase-2 mit einer schlechten Prognose verbunden (DeWaal et al., 2018; Sato-Tadano et al., 2013; Varghese et al., 2020). Die Inhibierung des Enzyms konnte nicht nur die Proliferation verlangsamen, sondern führte auch zu einer Umprogrammierung des Metabolismus in Tumorzellen in Richtung Atmung. Im hepatozellulären Karzinom ist das Enzym ebenfalls ein guter Angriffspunkt und gilt als ein vielversprechender Therapieansatz (Feng et al., 2020). Des Weiteren konnte eine erhöhte Aktivität der Phosphofruktokinase (PFK) in Tumorzellen detektiert werden. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Glykolyse und dem Tumorwachstum im hepatozellulären Karzinom (Feng et al., 2020). Auch hier korreliert das erhöhte Level der Kinase mit einer schlechten Überlebensprognosen.

Die Pyruvatkinase ist das letzte Schlüsselenzym der Glykolyse. In Säugern sind vier Isoformen der Pyruvatkinase bekannt und in unterschiedlichen Tumorzellen ist die Pyruvatkinase M2

(PKM2) hochreguliert. Durch die Verschiebung der Expression von Pyruvatkinase-Isoform M1 zur Isoform M2 erfolgt in den Zellen eine metabolische Anpassung an den neuen, fermentativen Stoffwechsel (Christofk et al., 2008; Van Niekerk & Engelbrecht, 2018). Die Überexpression von PKM2 korreliert ebenfalls mit einer schlechten Überlebensprognose (Feng et al., 2020). Die Aktivität ist abhängig vom Oligomerisierungszustand des Enzyms. Das Tetramer ist im Cytoplasma hoch katalytisch aktiv, setzt Phosphoenolpyruvat schnell um und beschleunigt den glykolytischen Fluss. Die Monomere und Dimere besitzen eine geringere katalytische Aktivität. Sie können in den Kern importiert werden, wo sie als Co-Aktivatoren fungieren. Hier induzieren sie mit Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene, die zur Tumor-Progression führen (Azoitei et al., 2016; Feng et al., 2020; Van Niekerk & Engelbrecht, 2018). Zudem konnte in einer weiteren Studie eine verminderte Aktivität der PFK und PKM2, die durch Cyclin-D3-CDK6-Kinase vermittelt wird, detektiert werden (Wang et al., 2017). In Tumorzellen sind D-Cycline sowie die CDK4/6 verstärkt exprimiert. Wang und Kollegen konnten eine physikalische Interaktion der Cyclin-D3-CDK6-Kinase mit PFK und PKM2 feststellen. Die Cyclin-D3-CDK6-Kinase phosphoryliert die beiden glykolytischen Enzyme und inhibiert dadurch die Tetramerisierung, was zu einer verminderten Enzymaktivität führt. Durch die reduzierte Aktivität der Enzyme können die glykolytischen Zwischenprodukte in den Pentosephosphat- und Serinsyntheseweg geleitet werden. Beide Synthesewege werden genutzt, um NADPH für den Abwehrmechanismus gegen reaktive Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“ ROS) zu generieren. Durch die Inhibierung der Cyclin-D3-CDK6-Kinase würde demnach weniger Glukose-6-Phosphat bzw. 3-Phosphoglycerat in die Seitenwege geleitet werden. Das verminderte NADPH führt zu einem gleichzeitigen Anstieg von ROS, gefolgt von einer ROS abhängigen Apoptose. Durch die Phosphorylierung der glykolytischen Enzyme schützt sich die Tumorzelle demnach vor zu hohem ROS und der Apoptose (Wang et al., 2017). So wird deutlich, dass durch die PKM2 ein Gleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen entsteht. Zudem ist der Eigenschutz durch Verhinderung von ROS ein essenzieller Bestandteil für den Erhalt der Krebszelle. Aus diesem Grund spielt Regulation der Pyruvatkinase eine wichtige Rolle in Tumorzellen und kann deshalb auch in unterschiedlichen Therapieansätzen, wie die Inhibierung der Tetramerbildung, angegriffen werden (Feng et al., 2020; Van Niekerk & Engelbrecht, 2018). Der allosterische Aktivator Fruktose-1,6-Bisphosphat ist außerdem ein Regulator der katalytischen Aktivität von PKM2 (Feng et al., 2020).

Das Fruktose-1,6-Bisphosphat spielt nicht nur in der Regulation der Pyruvatkinase eine Rolle, sondern auch bei der Aktivierung von Ras. Das Protoonkogen Ras sowie seine Regulatoren werden sowohl in der Hefe als auch in Säugerzellen exprimiert. Die Targetgene in den Organismen sind jedoch unterschiedlich. So aktiviert das Ras in der Hefe die Adenylatcyclase, in Säugern ist es die Raf-Protein-Kinase (Peeters et al., 2017; Thevelein & De Winde, 1999). Da in beiden Organismen sowohl Ras als auch die Regulatoren konserviert sind, kann davon ausgegangen

werden, dass die glykolytische Aktivierung des Protoonkogens dieselbe ist. Die Studie von Peeters und Kollegen geht davon aus, dass durch die verstärkte Glykolyse und das daraus resultierende Fruktose-1,6-Bisphosphat, Ras aktiviert wird. Die verstärkte Gärung in Tumorzellen würde demnach die Aktivierung des Protoonkogens nach sich ziehen (Peeters et al., 2017). Zudem wurde eine Verringerung der mitochondrialen Atmung, vermittelt durch das Fruktose-1,6-Bisphosphat, in der Hefe beschrieben (Díaz-Ruiz et al., 2008). Dies verdeutlicht, dass dieses Intermediat entscheidend für die Wahl des Stoffwechselweges ist.

Die Tumorzellen lenken den metabolischen Fluss Richtung Fermentation (Díaz-Ruiz et al., 2008). Im Vergleich dazu konnte in den untersuchten Mutanten der metabolische Fluss von der Fermentation hin zur Respiration gelenkt werden. Durch die Störung von eIF2 und die damit verbundene Inhibierung der Translationsinitiation war es nicht nur möglich den Glukose Metabolismus zu verändern, sondern auch die schnelle Zellproliferation zu inhibieren. Zudem konnte eine mithilfe der GFP-Markierung die Cdc19-Aktivität ermittelt werden. Es stellt sich die Frage, ob durch einen ähnlichen Ansatz Tumorzellen, die Glykolyse betreiben, ebenfalls in ihrem Energiemetabolismus verändert werden können. Schon jetzt werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, welche die verstärkte Glykolyse und Lactatbildung in Tumorzellen inhibieren. Als Beispiele wären zu nennen die Inhibierung der Hxk2, die zu einer Antiproliferation der Zellen jedoch mit toxischen Nebenwirkungen führte, oder die Aktivierung der Pyruvatkinase in Tumorzellen, was ebenfalls die Proliferation und somit das Tumorwachstum inhibiert (Luengo et al., 2017). Die Veränderung des Metabolismus der Tumorzellen könnte für die Krebstherapie ein wichtiger Ansatz sein. Es gibt hier bereits vielversprechende präklinische Modelle, jedoch bis jetzt kaum klinische Erfolge.

6 METHODEN

6.1 Arbeiten mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

Für die hier beschriebenen Experimente wurden Hefestämme mit den Stammhintergründen S288c und W303 verwendet (siehe Tabelle 7-7). Beide Hintergründe verhielten sich sehr ähnlich, auf Abweichungen wird in den jeweiligen Abschnitten näher drauf eingegangen.

6.1.1 Kultivierung, Lagerung und Konservierung der Hefe

Die Kultivierung der Hefe lief je nach Fragestellung differenziert ab. Um eine wachsende Kultur zu erhalten wurde eine 5 ml Vorkultur für etwa 10 h bei 30°C angesetzt. Das verwendete Medium war XY und die Kohlenstoffquelle variierte zwischen 2% Glukose, 2% Raffinose oder 2% Glycerin, je nach Experiment. Die Vorkultur wurde am Abend im entsprechenden Volumen des Mediums so verdünnt, dass die Zellen am nächsten Morgen exponentiell wachsend waren (OD₆₀₀ zwischen 0,3- 0,8). Die Kultivierung über Nacht erfolgte bei 25°C entweder im Glasröhrchen oder im Kolben.

Die verwendeten Hefestämme wurden auf XYD-Platten ausgestrichen, zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert und für mehrere Wochen bei 4°C gelagert. Um die hergestellten Stämme jederzeit wieder verwenden zu können erfolgte eine Konservierung. Hierfür mussten die jeweiligen Stämme bei 30°C in 3 ml XYD Medium über Nacht angezogen werden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation bei 800 g 2 min), in 1-2 ml 15%igem Glycerin resuspendiert und bei -80°C in der Stammsammlung gelagert.

6.1.2 Herstellung von Hefestämmen

Für die unterschiedlichen Experimente wurden neue Hefestämme generiert. Dies erfolgte mittels Transformation von Konstrukten, die ins Hefegenom integriert wurden. Ebenfalls wurden PCR-Produkte in die Hefe transformiert, die die zu untersuchenden Gene endogen markierten. Um die durch Transformation veränderten Stämme mit anderen mutierten Stämmen zu kombinieren, wurden diese miteinander gekreuzt, aussporuliert und es erfolgte eine Tetraden-Analyse.

6.1.2.1 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Die Lithium Methode für die Transformation in Hefe wurde zuerst 1983 von Ito et al. beschrieben. Hier wurde zuerst gezeigt, dass monovalente Kationen, vor allem die Verbindung von Lithiumaccetat (LiAc), die Effizienz der Transformation deutlich erhöhen (Ito et al., 1983; Kawai et al., 2010). Gietz und Woods modifizierten das Protokoll indem sie zusätzlich noch Träger DNA einsetzten, deren Rolle in der Transformation noch nicht geklärt ist (Gietz & Woods, 2002). In dem Protokoll wird zusätzlich Polyethylen Glykol (PEG), welches für das Anheften der zu transformierenden DNA an die Zellwand verantwortlich ist, verwendet. LiAc sowie der Hitzeshock bei 42°C ermöglicht das Aufnehmen der DNA in die Zelle (Kawai et al., 2010).

Für die Hefetransformation wurden 2 ml exponentiell wachsende Zellen ($OD_{600}=0,8$) bei 800 g für 2 min zentrifugiert und geerntet. Das Pellet wurde zwei Mal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Im letzten Waschschrift wurde der komplette Überstand entnommen und folgende Komponenten nacheinander auf die Zellen pipettiert:

PEG 3350 50% (w/v)	240 μ l
Heringssperma DNA in 1x TE (1:5 verdünnt)	50 μ l
Lineare DNA verdünnt in Wasser	34 μ l
<u>LiAc 1M</u>	<u>36 μl</u>
Gesamt	360 μ l

Der Ansatz wurde dann 4 mal 10 sec gevortext und 20 min bei Raumtemperatur (RT) gerollt. Daraufhin erfolgte der Hitzeshock bei 42°C für 15 min. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert, der komplette Überstand abgenommen, die Zellen in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert und auf eine entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert. Wurden Resistenzmarker für die Selektion verwendet, mussten die Zellen vor dem Ausplattieren für mindestens 3 h bei 30°C in XYD inkubiert werden, um die Resistenz auszubilden. Die Platten wurden bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert und von gewachsenen Transformanten erfolgte ein erneuter Ausstrich auf der entsprechenden Platte.

Integratives Plasmid am Markergen

Für die Hefe Transformation wurde Plasmid-DNA verwendet, die ins Hefegenom integriert wird. Dies hat den Vorteil, dass jede nachkommende Zelle die gleiche Menge der Plasmid-DNA aufweist. Die Integration beruht auf homologe Rekombination, wobei Sequenzen auf dem Plasmid vorliegen, die identisch zu denen am Integrationsort sind. Für eine effiziente Integration erfolgt eine Linearisierung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen (Abbildung 6-1), die im Selektionsmarker schneiden. Das geschnittene Plasmid kann wie beschrieben in die Hefe transformiert werden.

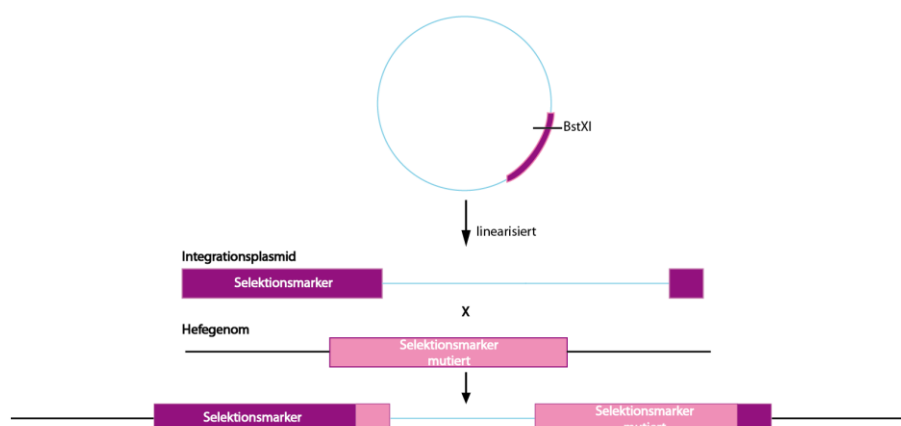


Abbildung 6-1: Integration der Plasmid-DNA am Selektionsmarker. In dunkelviolet ist die wildtypische Kopie des Markergens auf dem Plasmid und in Rosa die mutierte Kopie des Markergens auf dem Hefegenom dargestellt. Nach Linearisierung, hier mit BstXI und homologe Rekombination liegt der Selektionsmarker wildtypisch und mutiert im Hefegenom vor.

Die Hefe besitzt eine mutierte Kopie des Markergens, wohingegen der Marker als Wildtyp-Version auf dem Plasmid vorliegt. Durch die homologe Rekombination entsteht auf dem Hefegenom eine wildtypische und eine mutierte Kopie des Markergens. Durch diese Duplikation ist nun eine Mehrfachintegration der Plasmid-DNA möglich, welche mithilfe der qPCR ermittelt werden kann (siehe 6.2.6.4).

Veränderung eines endogenen Gens

Mithilfe von Pfa6a-, Pfa6a-link-, PyM- und PUG Systemen (Gueldener et al., 2002; Janke et al., 2004; Longtine et al., 1998; Sheff & Thorn, 2004) wurden Gene endogen verändert. Mithilfe dieser Systeme konnten die Gene deletiert oder C bzw. N-Terminal markiert werden.

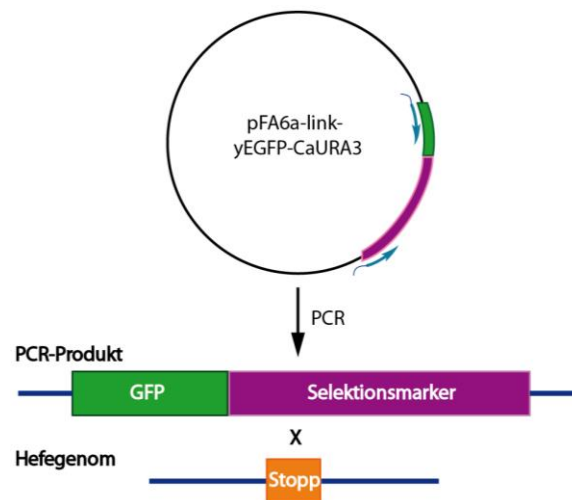


Abbildung 6-2: Markierung eines endogenen Gens. Bei der PCR binden die Primer an das pFA6a-link Plasmid. Des Weiteren haben die Primer spezifische Gen-Sequenzen, die nicht im Plasmid binden, jedoch notwendig für die homologe Rekombination sind. Mithilfe der Trafo wird hier am C-Terminus des endogenen Gens, vor dem Stoppcodon, die GFP- und Selektionsmarker-Sequenz, hier URA3, inseriert.

Die Veränderung des endogenen Gens basiert ebenfalls auf homologe Rekombination, bei der entweder das Gen durch einen Selektivmarker ausgetauscht oder ein „Tag“ inklusive eines Selektivmarkers an den C-bzw. N-Terminus inseriert wird. Das PCR-Produkt, mit den spezifischen Gen-Sequenz-Überhängen, wurde in die Hefe transformiert (Abbildung 6-2).

6.1.2.2 Kreuzung, Sporulation und Tetraden-Analyse

Mithilfe der Tetraden-Analyse können unterschiedlich mutierte Gene in der Hefe kombiniert werden. Der Vorteil ist, dass die zu vergleichenden Stämme immer die gleiche Veränderung des Gens aufweisen.

Für die Tetraden-Analyse erfolgte zuerst eine Kreuzung von zwei haploiden Stämmen mit unterschiedlichem Paarungstyp (*MATa* und *MATα*) gefolgt von der Selektion, durch entweder Auxotrophiemarker oder durch Resistenzen gegen Antibiotika. Hierfür wurden die jeweiligen Stämme in 5 µl Wasser resuspendiert und übereinander auf eine XYD-Platte getropft. Nach mindestens 6 h Inkubationszeit bei 30°C erfolgte die Selektion auf diploide Kolonien. Die Zellen wurden dafür auf eine Platte mit 2 Selektionsmarker ausgestrichen. Nach 2-3 Tagen konnten

diploide Einzelkolonien von der Platte entnommen und zu Sporulation angesetzt werden. Bei identischen Selektionsmarkern auf beiden Stämmen erfolgte eine direkte Sporulation nach der Kreuzung.

Hefezellen durchlaufen den meiotischen Zellzyklus bei Mangel an Nährstoffen, wie Kohlenstoff oder Stickstoff. Die diploide Zelle teilt sich und es entstehen vier haploide Sporen, die vom Ascus, einer Hülle, umschlossen sind. Diese umschlossenen Zellen sind die Tetraden, die mithilfe eines Mikroskops und einer Nadel voneinander getrennt werden können. Für die Analyse wurden die diploiden Stämme in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium für 6-8 h bei 30°C herangezogen. Daraufhin wurden die Zellen einmal in 2 ml nährstoffarmem Sporulationsmedium gewaschen (800 g 2 min), um die überschüssigen Nährstoffe zu entfernen. Die Zellen wurden im 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen und bei 25°C auf einem Roller inkubiert. Die Inkubationszeit betrug bei dem W303 Stammhintergrund etwa drei, beim S288c etwa 5 Tage. Für die Tetraden-Analyse erfolgte, um den Ascus zu verdauen, eine Inkubation von 50 µl Zellsuspension und 50 µl Novozym für 20 min bei RT. Das Gemisch wurde auf eine XYD-Platte getropft, trocknen gelassen und mithilfe eines Mikromanipulators erfolgte die Vereinzelung und Positionierung der Sporen. Die Inkubationszeit der Platten bei 30°C erfolgte je nach eingebrachter Mutation 3-7 Tage. Um den Genotyp zu bestimmen wurde jede einzelne Kolonie auf alle Selektionsmarker, die der diploide Stamm trug, getestet. Hierfür wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und mithilfe eines „Froggers“ auf die Selektionsplatten gestempelt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C konnte der Genotyp anhand des Wachstums auf den Platten ermittelt werden. Bei einem uneindeutigen Ergebnis aufgrund von Doppelbelegung eines Selektionsmarkers, sowie für die Ermittlung des Paarungstyps, wurde eine Kolonie-PCR (siehe 6.2.6.3) durchgeführt.

6.1.3 Wachstumstest

Die Hefezellen wurden hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit näher untersucht. Hierfür wurden stationäre Zellen ($OD_{600} > 2,5$) herangezogen. Diese wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und 200 µl in eine 96 Well-Mikrotiter-Platte überführt. Es erfolgte eine Verdünnung in fünf Schritten, jeweils 1:10. Diese Verdünnungsreihe wurde mithilfe eines „Froggers“ auf je 3 Platten mit der gleichen Kohlenstoffquelle gestempelt, wobei je eine bei 25°, 30° und 37°C inkubierte. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde ein Foto der Platten gemacht und mit Adobe-Photoshop bearbeitet.

6.1.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können die Hefen hinsichtlich ihres Zellteilungsstadiums, aufgrund eines DNA interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs, analysiert werden. Die Menge des gemessenen Farbstoffs gibt Rückschlüsse über den DNA-Gehalt der Zelle. Hierfür wurden 0,25 OD_{600} von wachsenden Zellen geerntet (800 g, 2 min zentrifugiert), in 150 µl Wasser resuspendiert und mit 350 µl 100%igem Ethanol fixiert. Die Zellen konnten in dem fixierten

Zustand für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Bei der Aufarbeitung mussten die Zellen zunächst mit 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen werden, hierfür wurden sie 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (16000 g) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen erneut in 250 µl Natriumcitrat-Puffer resuspendiert. Um die Zellen voneinander zu separieren erfolgte eine Ultraschall-Behandlung (6-8 Pulse bei 40% Leistung). Daraufhin wurden die Zellen, nach Zugaben von 10 µl RNase (10 mg/ml), für 60 min bei 50°C im Thermomixer inkubiert. Um ein Absetzen der Zellen zu verhindern erfolgte alle 20 min ein mehrfaches Invertieren der Zellen. Nach Ablauf der Zeit wurde 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugefügt und erneut unter denselben Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (16000 g, 30 sec), der Überstand verworfen und diese mit 250 ml Natriumcitrat-Puffer, versetzt mit 1 µM „*Sytox Green*“, resuspendiert und für 3 Tage im Dunkeln bei 4°C auf einem Schüttler gefärbt. Um sicherzugehen, dass keine Zellaggregate gemessen werden, erfolgte nach der Inkubation eine erneute Ultraschall Behandlung (6-8 Pulse bei 40% Leistung). Die Messung wurde am Durchflusszytometer CyFlow Space (Partec) durchgeführt. Hierfür wurden 10-30 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Tris/HCL (50mM, pH 7,5) verdünnt, um 150-300 Ereignisse pro Sekunde zu erhalten. 20000 Zellen im FL1 Kanal (Gain: 545, x-Achse: linear) wurden von jeder Probe gemessen. Die Darstellung der DNA-Profile erfolgte mit dem WinMDI 2.8 Programm, die Quantifizierung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen wurde mit der Software FCS Express 4 durchgeführt.

6.1.5 Lebend-Zell Mikroskopie

Mithilfe der Mikroskopie in lebenden Hefezellen konnten GFP- und *mCherry*-Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation und Struktur untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen im entsprechenden Medium herangezogen und geerntet (800 g, 2 min). Bei Aufnahmen über einen bestimmten Zeitraum wurden 4 µl Zellen in eine Bidi-Kammer pipettiert, mehrfach resuspendiert und mit einem entsprechenden Agar-Block bedeckt. Die Zeitaufnahmen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 30°C. Bei Übersichtsaufnahmen wurden 4 µl Zellen auf ein Deckglas (24x 60 mm) pipettiert und mit einem entsprechenden Agar-Block auf einem Deckglas (20x 20 mm) bedeckt. Für den Agar-Block wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Kohlenstoffquellen verwendet, alle anderen Komponenten blieben dieselben.

10 x Dropout ++	3 ml
10 x YNB	3 ml
Kohlenstoffquelle (20% Glukose o. 20% Glycerin o. 20% Saccharose)	3 ml
<u>0,75% Agarose in H₂O</u>	<u>21 ml</u>
Gesamt	30 ml

Die Präparate wurden mit einem „*spinning disc*“-System und einer „*Axiocam MRm*“ an einem inversen Mikroskop Observer Z.1 aufgenommen. Die Z-Stapel variierten zwischen 14 und 16 Ebenen mit einem Abstand von je 0,6 μm . Die Belichtungszeit sowie die Laserintensität, wobei GFP-Signale mit dem 488 nm Laser und die *mCherry*-Signale mit dem 561 nm Laser detektiert wurden, veränderten sich je nach markiertem Protein (Tabelle 6-1).

Tabelle 6-1: Laserintensitäten und Belichtungszeiten der „*Spinning-disc*“-Mikroskopie.

Fluoreszenz Signal	Laserintensität [%]	Belichtungszeit [ms]	Abbildung
<i>mCherry</i> -NLS W303 (561 nm)	7	200	
<i>mCherry</i> -NLS S288c (561 nm)	6	200	
Sic1-GFP W303 (488 nm)	20	200	4-4, 4-7
Sic1-GFP S288c (488 nm)	15	200	4-4
Sso1-GFP W303 (488 nm)	3	200	4-5, 4-7
Sso1-GFP S288c (488 nm)	3	200	4-5
Mit-PRE Seq-GFP W303 (488 nm)	4	200	4-15
Hap4-GFP W303 (488 nm)	50	200	4-16
Mig1-GFP W303 (488 nm)	20	200	4-18, 4-20, 4-21, 4-23
Mig1-GFP W303 (488 nm) (Film)	17	100	4-18
Hxk2-GFP W303 (488 nm)	2,3	100	4-25
Pfk1-GFP W303 (488 nm)	2,3	100	4-27
Pfk2-GFP W303 (488 nm)	2,3	100	4-27
Tdh3-GFP W303 (488 nm)	2,3	10	4-31
Pgk1-GFP W303 (488 nm)	2,3	20	4-31
Eno2-GFP W303 (488 nm)	2,3	10	4-31
Cdc19-GFP W303 (488 nm)	2,3	10	4-31-4-37, 10-8
Snf1-GFP W303 (488 nm)	15	200	10-6
Maf1-GFP W303 (488 nm)	20	200	10-7
Spc42 <i>mCherry</i> W303 (561 nm)	50	200	10-8
Mit-PRE Seq <i>mCherry</i> W303 (561 nm)	7	200	10-8

Zeitreihen Aufnahmen erfolgten in unterschiedlichen Zeitabständen (30 sec-10 min) und mit variierender Gesamtdauer (30 min–180 min). Der Zellkern wurde durch das Fusionsprotein *mCherry*-NLS detektiert. Hierbei wurde der C-terminale Bereich von Swi5 (AS 569-709) als NLS

herangezogen. Um einen Kernimport zu ermöglichen musste jedoch die Cdk1-Phosphorylierungsstelle mutiert werden (S646A und S664A) (Moll et al., 1991). Das Fusionsprotein unterlag einem *pTEF2*-Promotor und wurde somit konstitutiv exprimiert. Die aufgenommenen Zellen in der Übersicht, und auch in den Zeitreihen, wurden mit Image J bearbeitet. Wobei für die Darstellung der Bilder die maximale Projektion der Z-Stapel verwendet wurde.

Um die Signale im Kern zu quantifizieren wurde zuerst ein Pixel Schwellenwert festgelegt, durch den das Hintergrundsignal entfernt wurde. Für jede Zelle des gleichen Experimentes wurde immer derselbe Schwellenwert herangezogen. Daraufhin wurden die Kernregion in allen Ebenen ausgewählt und die „*integrated density*“ aus allen Ebenen addiert. Die „*integrated density*“ des zu analysierenden GFP-Signals wurde aus der Kernregion, die im ersten Schritt markiert wurde, über alle Ebenen hinweg ebenfalls addiert. Da in den Zellen unterschiedlich große Kerne vorliegen, wurde das GFP-Signal einer Zelle auf das jeweilige *mCherry*-Kernsignal normiert (GFP/*mCherry*).

Für die statistische Auswertung wurden mindestens 50 Zellen verwendet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte, wenn eine Normalverteilung nach dem Shapiro Wilk Test vorlag, durch einen ungepaarten t-Test. Bei keiner vorhandenen Normalverteilung wurde der Mann-Whitney Test herangezogen.

Um das Volumen der Zelle zu ermitteln, wurde die Formel eines Ellipsoids verwendet (Formel 6-1). Hierfür wurde mithilfe von Image J die Länge und Breite gemessen. Für die Höhe wurde ermittelt, in wie vielen Z-Ebenen das Signal zu finden ist. Daraufhin wurde die ermittelte Anzahl der Ebenen mit dem Abstand zwischen einer Z-Ebene (0,6 µm) multipliziert. Das Volumen konnte im nächsten Schritt berechnet werden.

Formel 6-1: Berechnung des Zellvolumen (Vol).

$$Vol = \frac{4\pi}{3} * abc$$

$$a = \frac{1}{2} * Länge; b = \frac{1}{2} * Breite; c = \frac{1}{2} * Höhe$$

Mithilfe eines Image J Plug-Ins „*MitoLoc*“ und nach der Methode von Vowinckel und Kollegen war es möglich das Volumen und die Oberfläche der Mitochondrien zu ermitteln. Hierfür wurde zunächst ein Pixel Schwellenwert festgelegt, um auch hier das Hintergrundsignal zu entfernen. Daraufhin konnte das Volumen und Oberfläche mit „*MitoLoc*, *Yeast MitoMap*“ ermittelt werden (Vowinckel et al., 2015).

6.1.6 GCN4-lacZ Reporter-Assay

Die *GCN4*-Expression konnte mithilfe eines *lacZ*-Reporters, in dem die β -Galactosidase-Aktivität gemessen wurde, bestimmt werden. Die Aktivität konnte mithilfe des Substrates ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) nachgewiesen werden (Ausubel et al., 2005;

Perzmaier, 2011) Hierfür wurde ein Reporter-Plasmid p180 (Hinnebusch, 1985) mit einem *URA3* Marker herangezogen. Für den Assay wurde zusätzlich noch das Plasmid pWS3396, welches einen *LEU2*-Marker enthielt, genutzt.

Beide Plasmide wurden in die Hefestämme transformiert (vgl. 6.1.2.1) und auf *URA3* bzw. *LEU2* selektiert. Die transformierten und selektierten Stämme wurden für den Assay im Selektivmedium angezogen, um einen Plasmid Verlust zu vermeiden. Von den exponentiell wachsenden Zellen wurde 1 OD₆₀₀ geerntet (16000 g, 3 min) und in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Ebenfalls wurde 1 ml Z-Puffer als eine Referenz mitgeführt. Von den Proben, inklusive Referenz, wurden 100 µl entnommen in 900 µl H₂O und die OD₆₀₀ gemessen. Mit den verbleibenden 900 µl der Proben bzw. der Referenz wurde der Assay durchgeführt. Hierbei wurde 50 µl Chloroform und 10 µl 0,25% SDS zu den Proben dazugegeben und 15 min bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, jeweils frisch angesetzt). Die Proben wurden daraufhin weitere 15 min bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert und die Reaktion mit 1M Na₂CO₃ abgestoppt. Bei Proben mit starker gelb Färbung, wurde die Reaktion schon früher gestoppt (2-5 min), da sonst die Messung im gesättigten Bereich läge. Die Zeit bis zum Abstoppen wurden notiert, da sie für die Berechnung der Aktivität nötig war. Die Proben wurden daraufhin 1 min bei 16000 g abzentrifugiert und 1 ml in eine Küvette überführt. Die Absorption bei 420 nm (A₄₂₀) wurde mithilfe des Photometers bestimmt. Als Nullabgleich wurde der Referenzwert verwendet. Mithilfe der Formel 6-2 konnte die β-Galaktosidase-Aktivität berechnet werden.

Formel 6-2: Berechnung der β-Galaktosidase-Aktivität.

$$\frac{1000 * A_{420}}{t * V * OD_{600}}$$

A₄₂₀ = Absorption des Überstand bei 420 nm

V = Das eingesetzte Zellvolumen 0,9 ml

t = Zeit bis zum Abstoppen

OD₆₀₀ = optische Dichte der Zellen

6.1.7 Glukose-Assay

Der Glukose-Assay wurde von dem Hersteller Megazym herangezogen. Hierbei wird die im Medium vorhandene Glukose durch die Glukose-Oxidase und im zweiten Schritt nach Zugabe von 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Aminoantipyrine durch eine Peroxidase zu dem Chinonimine Farbstoff und Wasser umgesetzt. Dieser Farbstoff wird bei einer Absorption von 510 nm gemessen.

Die Zellen wurden über Tag angezogen und über Nacht in XYD so in einem 100 ml Kolben angeimpft, dass sie am nächsten Morgen exponentiell wachsend waren. Jede Stunde wurden 500 µl der Zellen entnommen, die OD₆₀₀ gemessen und die Zellen bei 2 g für 2 min abzentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C gelagert, bis alle Proben gesammelt waren. Es wurden so lange Zellen entnommen, bis diese eine OD₆₀₀ größer als 4 hatten. 70 µl der Proben wurden vor der Messung in 930 µl Medium ohne Glukose

verdünnt. Dieses Medium diene ebenfalls auch als Referenzprobe. Von den verdünnten Proben und auch von der Referenz Probe wurde 34 µl in 1 ml Lösung aus dem Kit pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine 20-minütige Inkubation des Gemisches bei 45°C, gefolgt von der Messung bei A₅₁₀ nm, welches zuvor durch die Referenzprobe auf null gesetzt wurde. Um sicherzustellen in welchem Bereich der Assay linear war, wurde vor der Probenmessung eine Standardkurve mit der im Labor verwendeten Glukose durchgeführt. Hierbei wurde die Stammlösung 0,2 bis 0,02% in Wasser verdünnt und gemessen. Die Glukosekonzentration konnte mithilfe der Standardkurve ermittelt werden.

6.2 Molekularbiologische Methoden

Mithilfe dieser Methoden wurden Konstrukte hergestellt. Außerdem konnte das Transkriptionslevel von bestimmten mRNAs aus der Hefe untersucht werden. Eine weitere Methode beschreibt die Isolierung von Polysomen-assoziierte mRNAs, die daraufhin mit der RNA-Sequenzierung analysiert wurde.

6.2.1 Genomische DNA-Isolierung aus Hefe

DNA wurde aus der Hefe isoliert, damit diese entweder für die Konstrukt Herstellung herangezogen oder die Integrationshäufigkeit im Hefegenom getestet werden konnte. Sie diene außerdem als Template bei der quantitativen Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR), um die Effizienz der Primer zu testen.

Für die Isolierung wurden die Hefen über Nacht in 5 ml XYD angezogen, am nächsten Tag geerntet (2 min bei 800 g) und einmal mit Wasser gewaschen. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Wasser resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß mit etwa 0.3 g Glasperlen überführt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet 100 µl Tris/EDTA/SDS Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 1% SDS) gegeben. Der Aufschluss erfolgte mechanisch bei 4°C in einer Retsch-Mühle bei voller Leistung (Frequenz 30/sec) für 10 min. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 500 µl Tris/EDTA/SDS Lösung und eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Nach Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation bei 16000 g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 1 ml 100%igem Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde nach wiederholtem Invertieren abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 20 min bei RT getrocknet. Die präzipitierte DNA wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) bei 65°C für 30 min behandelt. Daraufhin erfolgte eine erneute Präzipitation durch Zugabe von 500 µl 100%igem Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei -20°C. Der Ansatz wurde anschließend abzentrifugiert, das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, der Überstand komplett abgezogen und für etwa 20 min getrocknet. Die DNA wurde daraufhin in 50 µl Wasser bei 65°C gelöst. In einem 0,75%igem Agarose Gel konnte die DNA überprüft

werden (siehe 6.2.7), dabei erfolgte ein Auftrag von 1 µl unverdünnter und 1 µl 1:2 sowie 1:5 verdünnter DNA.

6.2.2 RNA Isolierung aus Hefe

Die RNA wurde aus der Hefe isoliert, um das Transkriptionslevel bestimmter Gene zu untersuchen, sowie Polysomen-assoziierte mRNA hinsichtlich ihrer Translationseffizienz zu analysieren. Um eine Degradation durch RNasen zu verhindern, wurde mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelten Lösungen und speziellen RNA Pipetten und Spitzen gearbeitet.

Für die Gesamt-RNA Isolation wurden 5 OD₆₀₀ von einer im Kolben exponentiell wachsenden Kultur (OD₆₀₀ 0,5-0,8) geerntet (2 min bei 800 g), der Überstand verworfen, mit 1 ml kaltem Wasser resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde daraufhin bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl TES Lösung (10 mM Tris Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS) resuspendiert. Auf die Zellen in TES wurden im nächsten Schritt für die Lyse 400 µl heißes Phenol (vorgewärmt bei 65°C) dazugegeben. Der Ansatz nach kurzem vortexen bei 65°C 60 min auf einem Thermomixer inkubiert, wobei alle 15 min der Ansatz für 10 sec gevortext wurde. Nach der Inkubation wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt und danach 5 min bei 4°C und 16000 g zentrifugiert. Die obere, wasserhaltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Phenol zugegeben und kräftig gevortext. Der Ansatz wurde erneut 5 min auf Eis inkubiert und bei 16000 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Die obere, wasserhaltige Phase abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 400 µl Chloroform hinzugefügt und wiederholt bei 16000 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Um die RNA aus der Lösung zu präzipitieren, wurde die komplette obere Phase abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 ml kalter (bei -20°C) 100%iger Ethanol und 40 µl Natriumacetat (3 M pH 5,3) zugefügt und gevortext. Die Fällung wurde bei -80°C über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 16000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 70%igem kaltem Ethanol (verdünnt in DEPC-Wasser) gewaschen und erneut für 30 min bei 4°C und 16000 g zentrifugiert. Der Alkohol wurde komplett entnommen, die RNA für 30 min bei RT getrocknet und daraufhin in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die gelöste RNA wurde 1:10 in DEPC-Wasser verdünnt, die Konzentration bestimmt (siehe 6.2.3) und 200 ng auf ein 2%iges Agarose Gel (siehe 6.2.7) zur Quantifizierung aufgetragen. Die Quantifizierung erfolgte über Image J. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

6.2.3 Konzentrations- und Reinheitsmessung von DNA und RNA

Die Konzentration der DNA sowie der RNA kann anhand der optischen Dichte bei der Wellenlänge von 260 nm ermittelt werden. Die Menge an ultraviolettem (UV)- Licht, die von der DNA und RNA absorbiert wird, ist proportional zum Gehalt der Nukleinsäure. Ist der Wert der Absorption 1,0 bei 260 nm, so entspricht das einer Konzentration von 50 µg/ml. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Aus dem Verhältnis der beiden Wellenlängen (A_{260}/A_{280}) kann die Reinheit der Probe bestimmt werden. Der Wert sollte

zwischen 1,8 -2,0 liegen. Liegt der gemessene Wert unterhalb, so ist die Probe mit Proteinen oder Phenolen verunreinigt (Brown et al., 2007).

Für die Nullwertbestimmung am DeNovix wurden 1,5 µl H₂O eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der Probe wurde ebenfalls mit 1,5 µl durchgeführt.

6.2.4 Synthese der komplementären DNA

Das Prinzip der cDNA („*complementary*“ DNA)-Synthese ist eine reverse Transkription. Hierbei wird ein Enzym verwendet, die Reverse Transkriptase, die RNA als Matrize benutzt und einen komplementären DNA-Strang aufbaut (Reineke, 2004).

Für die cDNA-Synthese wurden 50 ng der zuvor isolierten RNA eingesetzt (vgl. 6.2.2). In dem hier verwendeten Verfahren, erfolgte die reverse Transkription in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde ein Reagenz zugegeben, welches noch vorhandene DNA in dem isolierten RNA-Ansatz beseitigt. Die Inkubation betrug 2 min bei 45°C. Danach wurde zum Ansatz 4 µl eines Mix zugefügt, der sich aus dNTPs, einer Mischung aus zufälligen- und Oligo-dT-Primer und Reverser Transkriptionspuffer sowie 1 µl der Reversen Transkriptase zusammensetzt. Die enthalten Primer binden somit an den Poly-A-Schwanz der mRNA, sowie zufällig an der ganzen RNA. Die Reverse Transkription lief in mehreren Schritten, wie in Tabelle 6-2 aufgeführt, ab.

Die Reagenzien wurden von dem QuantiNova Reverse Transkriptions-Kit von Qiagen herangezogen. Danach wurde die cDNA 1:5 mit Wasser verdünnt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 6-2: Pipettierschema und Ablauf der reversen Transkription.

Lösungen	Menge pro Ansatz	Temperaturprofil
RNA	50 ng	
gDNA Beseitigungsmix	2 µl	2 min bei 45°C
Wasser	Ad 15 µl	
		3 min 25°C Bindung
Reverser Transkriptionsmix (5x)	4 µl	10 min 45°C Reverse
Reverse Transkriptase (5U/µl)	1 µl	Transkription
		5 min 85°C Inaktivierung

6.2.5 Designen von Primer

Zur Vervielfältigung von DNA und cDNA Fragmenten, mithilfe der PCR, werden Oligonukleotide (Primer) benötigt. Die Primer sind einzelsträngig und dienen als Startpunkt der DNA-Polymerasen. Sie binden am 3'-Ende der denaturierten DNA bzw. cDNA.

Die zur Primer-Herstellung verwendeten Internetseiten sind im Abschnitt 7.5.1 aufgeführt. Für die jeweiligen Fragestellungen wurden unterschiedliche Primer designt. Für die Klonierung eines bestimmten Gens wurde die komplette Sequenz verwendet. Die Primer lagen am Start und am Stopp des ORFs. Zusätzlich zu der Gensequenz wurden am Anfang des jeweiligen Primers eine

Restriktionsenzym-Erkennungssequenz von Enzymen, die nicht im Gen schneiden, sowie vier zufällige Basen angefügt. Diese stellten einen Linker dar und erleichtern somit die Ligation in den Vektor. Für eine Gendeletion wurden 50 Basen vor dem Start und hinter dem Stopcodon für die Primer verwendet. Bei der endogenen C-terminalen Epitop-Markierung wurden für die Primer 50 Basen vor und hinter dem Stopcodon ausgewählt. Für die N-terminale Epitop-Markierung wurden die Sequenzen vor und hinter dem Startcodon entnommen. Bei der Deletion sowie bei der Epitop-Markierung wurden zusätzlich Primer angefügt, die in einem Plasmid binden, um den Selektionsmarker mit oder ohne Epitop zu amplifizieren (Gueldener et al., 2002; Janke et al., 2004; Longtine et al., 1998; Sheff & Thorn, 2004). Die Primer, die spezifisch im Gen gebunden haben, lagen nach der PCR als Überhang vor und durch homologe Rekombination konnten sie daraufhin an der bestimmten Stelle das amplifizierte Stück rekombinieren (siehe Abbildung 6-2). Zur Überprüfung der Deletion wurden weitere Primer hergestellt. Hierfür wurde ein Primerpaar designt, welches das intakte und das deletierte Gen nachweisen. Für das deletierte Gen wurde der vordere Primer vor dem Startcodon gesetzt, der Rückprimer lag im Promoter der Markersequenz und war für alle Deletionen im pFA6a-System („reverse“ Primer: 821) derselbe. Für das intakte Gen wurde der identische vordere Primer, der auch für die Deletions-Überprüfung herangezogen wurde, gewählt. Für den reversen Primer wurde eine Sequenz innerhalb des Gens verwendet. Die Länge des PCR-Produktes war in beiden Fällen ähnlich und lag zwischen 600 und 800 bp. Die Schmelztemperatur wurde ebenfalls aufeinander abgestimmt. Bei den Primern für die qPCR musste die Schmelztemperatur bei allen Primern gleich sein, damit Ansätze mit unterschiedlichen Primern in einen Lauf verwendet werden konnten. Diese wurde bei 60°C festgelegt. Mit dem „*Oligo Calculator*“ (siehe 7.5.1) wurde bei allen Primern der Guanin- bzw. Cytosin-Gehalt und die Schmelztemperatur geprüft. Es sollte ebenfalls sichergestellt werden, dass der Primer mit Guanin oder Cytosin endet, da diese wegen der dreifach Wasserstoffbrücken Bindung eine bessere Stabilität gewährleisten. In Tabelle 7-9 sind die verwendeten Primer aufgeführt. Die Primer wurden von der Firma Eurofins bezogen und mit H₂O resuspendiert, und 1:10 verdünnt, sodass eine Konzentration von 10 pmol vorlag.

6.2.6 Polymerasen-Kettenreaktion

Bei der PCR wird ein bestimmter Bereich einer DNA in mehreren Zyklen millionenfach neu synthetisiert (Brown et al., 2007). Nach jedem Zyklus verdoppelt sich die Ausgangsmenge des Templates (Mülhardt, 2009). Für die Vervielfältigung der Sequenz wird ein Thermocycler, sowie ein Gemisch, bestehend aus einem DNA-Template, Oligonukleotide, Desoxyribonukleosid-triphosphat- (dNTP) Mix, Magnesium Chlorid, Puffer und eine DNA-Polymerase benötigt.

6.2.6.1 KOD-PCR

Für die Amplifizierung eines Gens aus genomischer DNA sowie Fragmente aus einem Plasmid wurde die KOD-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* (siehe Tabelle 7-4) verwendet. Für diese Zwecke war es notwendig fehlerfreie DNA zu vervielfältigen, weshalb sich die KOD mit ihrer Korrekturlesefunktion als gute Polymerase eignete.

Von der zuvor isolierten und verdünnten DNA (vgl. 6.2.1) bzw. von der Plasmid-DNA (siehe Tabelle 7-8) wurde 0,5–1 µl in einen 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Der komplette PCR-Ansatz (Tabelle 6-3) wurde in den Thermocycler gestellt und das Programm konnte gestartet werden. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Temperaturprofile verwendet.

Tabelle 6-3: KOD-PCR-Ansatz.

Lösungen	Mengen pro Reaktion
KOD-DNA-Polymerase Puffer (10x)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2mM)	5 µl
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	Je 3 µl
Template DNA	0,5-1 µl
KOD-Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Für die Amplifikation eines Gens aus genomischer DNA, welche anschließend in einen Vektor kloniert wurde, ist folgendes Programm eingesetzt worden:

PCR-Programm Gen Amplifikation aus genomischer DNA

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 25-30 Zyklen
Denaturierung	94°C	→ 30 sec	
Annealing	53-64°C	→ 30 sec	
Elongation	72°C	→ 1 kb/ 1 min	
Finale Elongation	72°C	→ 5 min	

Des Weiteren sollten bestimmte Gene im Genom manipuliert werden. Hierfür wurden Plasmide genutzt, die eine Markersequenz und je nach Manipulation ein Epitop (HA3 oder FLAG12) oder eine GFP-Sequenz besaßen. Nach der Amplifikation und Transformation des Produktes in die Hefe, wurde durch homologe Rekombination das endogene Gen manipuliert. Für die C-terminale Epitop-Markierung sowie für die Deletion von Genen wurde das pFA6a-System mit folgendem Temperaturprofil verwendet (Longtine et al., 1998):

PCR-Programm pFA6a-System

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94°C	→ 1 min	
Annealing	60°C	→ 1 min	
Elongation	72°C	→ 105 sec	
Finale Elongation	72°C	→ 5 min	

Für die Deletion von Genen, wurde aufgrund der zusätzlichen Markergene noch das pUG System herangezogen (Gueldener et al., 2002)

PCR-Programm pUG-System

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	94°C	→ 1 min	
Annealing	65°C	→ 1 min	
Elongation	72°C	→ 110 sec	
Finale Elongation	72°C	→ 5 min	

Für Proteine, die im Mikroskop näher untersucht werden sollten, hinsichtlich ihrer Lokalisation, Häufigkeit oder Struktur, wurde GFP verwendet. Das genutzte System hat im Gegensatz zum pFA6a System eine optimierte Codon-Nutzung, was eine bessere Detektion des Proteins zur Folge hat (Sheff & Thorn, 2004).

PCR-Programm pFA6a-link-System

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95°C	→ 40 sec	
Annealing	65°C	→ 20 sec	
Elongation	72°C	→ 90 sec	
Finale Elongation	72°C	→ 5 min	

6.2.6.2 Gezielte Mutagenese mittels PCR

Für die gezielte Mutagenese wird ein bestimmtes Gen, welches schon zuvor in den Blueskript kloniert und überprüft wurde, verwendet. Hierbei wird das gesamte Plasmid, in dem sich das zu mutagenisierende Gen befindet, amplifiziert. Dieses Plasmid sollte nicht größer als etwa 10 kb sein (Braman et al., 1996). Die Primer wurden so designt, dass sie an der Stelle des Gens binden, die verändert werden soll. Hierbei tragen beide Primer die gewünschte Mutation, sind etwa 50 Basen lang und komplementär zueinander. Um nach der Amplifikation nur das neu synthetisierte Plasmid im Ansatz zu erhalten, musste dieses vor der Transformation in den *E.coli* Stamm dH5 α , mit DpnI (siehe Tabelle 7-4) geschnitten werden. Durch diesen Restriktionsverdau wird das ursprüngliche methylierte Plasmid an der Sequenz 5'-GAmTC-3' zersetzt, wohingegen das neu synthetisierte Plasmid, welches keine Methylierungsstellen besitzt, nicht durch den Verdau beeinträchtigt wird. In Tabelle 6-4 ist der PCR-Ansatz für die gezielte Mutagenese dargestellt. Nach der PCR erfolgte der DpnI-Restriktionsverdau für mindestens 3h bei 37°C. Hierbei wurde zum gesamten Ansatz 10 U des Enzyms zugefügt. Bevor der Ansatz in den *E.coli* Stamm dH5 α transformiert wurde, erfolgte eine Dialyse des Ansatzes. 5 μ l des dialysierten Ansatzes wurden für die Transformation eingesetzt (vgl. 6.1.2.1).

Tabelle 6-4: PCR-Ansatz gezielte Mutagenese.

Lösungen	Mengen pro Reaktion
KOD-DNA-Polymerase Puffer (10x)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
dNTP-Mix (2mM)	5 µl
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	Je 3 µl
Template DNA	20 ng
KOD-Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

PCR-Programm gezielte Mutagenese

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94°C	→ 1 min	
Annealing	50°C	→ 1 min	
Elongation	72°C	→ 1 kb/ 1 min +1 min	
Finale Elongation	72°C	→ 5 min	

6.2.6.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde für die Bestimmung des Hefe Paarungstyps (Huxley et al., 1990) und für die Überprüfung von Gendelektionen herangezogen. Der Unterschied zu der Standard-PCR besteht darin, dass anstelle von isolierter DNA, einzelne Hefekolonien verwendet werden. Durch die Initial-Denaturierung bei 94°C und durch die Zusammensetzung des Puffers (125 mM Tris/HCl pH 8,5; 560 mM KCl) erfolgt die Lyse der Zellen sowie die Freisetzung der DNA. Eine geringe Menge einer Einzel Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in ein Reagenzgefäß mit PCR-Ansatz resuspendiert. Der PCR-Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 6-5 dargestellt, vorbereitet. Das Endvolumen betrug 25 µl pro Ansatz. Für die Bestimmung des Paarungstyps wurde 3 µl eines Primer-Mix, bestehend aus den Primer WS826/827/828 (10pmol/µl, siehe Tabelle 7-9), verwendet.

Tabelle 6-5: Kolonie-PCR-Ansatz.

Lösungen	Mengen pro Reaktion
Kolonie Puffer mit MgCl ₂ (10x)	2,5 µl
dNTP-Mix (2mM)	2,5 µl
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	Je 1,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 20 µl

Kolonie-PCR-Programm

Initial-Denaturierung	94°C	→ 4 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	→ 1 min	
Annealing	55°C	→ 1 min	
Elongation	72°C	→ 40 sec	
Finale Elongation	72°C	→ 3 min	

6.2.6.4 Quantitative-PCR

Mithilfe der qPCR kann eine Aussage über die Ausgangsmenge der DNA-Fragmente getroffen werden. Die entstehenden Produkte verdoppeln sich zunächst. Nach einer gewissen Zyklen-Anzahl wird jedoch eine Sättigung erreicht, die durch das Absinken der Konzentrationen der Primer und Nukleotide bedingt ist. Die Berechnung der Menge muss in der exponentiellen Phase erfolgen. Das Prinzip der durchgeführten qPCR ist, dass im Mastermix ein vorhandener interkalierender Fluoreszenzfarbstoff („*SYBR Green*“) an doppelsträngige DNA bindet. Die Mengenbestimmung findet während der PCR in Echtzeit statt. Je mehr von dem PCR-Produkt vorhanden ist, umso stärker ist die Intensität des vom Farbstoff emittierten Fluoreszenzsignals (Reineke, 2004). Die weiteren Bestandteile des Mastermix sind die Hot Start *Taq*-DNA Polymerase und der PCR-Puffer (siehe Tabelle 7-5). Für die Quantifizierung wird davon ausgegangen, dass die Intensität des Fluoreszenzsignals von der Ausgangskonzentration des Templates abhängt. Je höher die Konzentration des zu untersuchenden DNA-Abschnittes ist, desto früher ist das Signal sichtbar und desto weniger Zyklen sind notwendig, um eine bestimmte Menge zu erhalten. In den Fluoreszenzkurven wird die Intensität gegen die Zyklen-Anzahl der PCR aufgetragen (Abbildung 6-3 A). Aus ihnen kann abgelesen werden, wie viele Zyklen für eine Probe notwendig sind, damit das Signal einen definierten Schwellenwert überschreitet. Dieser Wert wird C_T -Wert genannt („*cycle threshold*“, Zyklus Schwellenwert).

Bevor die mRNAs quantitativ bestimmt werden konnten, musste zunächst die Effizienz dieser Primer ermittelt werden. Die Effizienz ist notwendig, um sicherzugehen, dass nach jedem Zyklus die doppelte Menge des Ausgangsproduktes vorliegt. Hierbei wurde genomische DNA (gDNA) in 1:10 Verdünnungsschritten ausgehend von etwa 100 ng für die qPCR eingesetzt. Der C_T -Wert wurde gegen die logarithmische DNA-Konzentration aufgetragen. Ein Diagramm wurde erstellt, welches eine Linearität aufweisen sollte. Hierbei konnte durch die lineare Visualisierung und durch die Berechnung der Effizienz nach Formel 6-3 festgestellt werden, ob die Zyklen-Anzahl proportional zur Konzentration war. Um eine Proportionalität zu gewährleisten sollte die Effizienz der Primer bei eins liegen, dann liegt eine Verdopplung des Amplifikats pro Zyklus vor (Reineke, 2004).

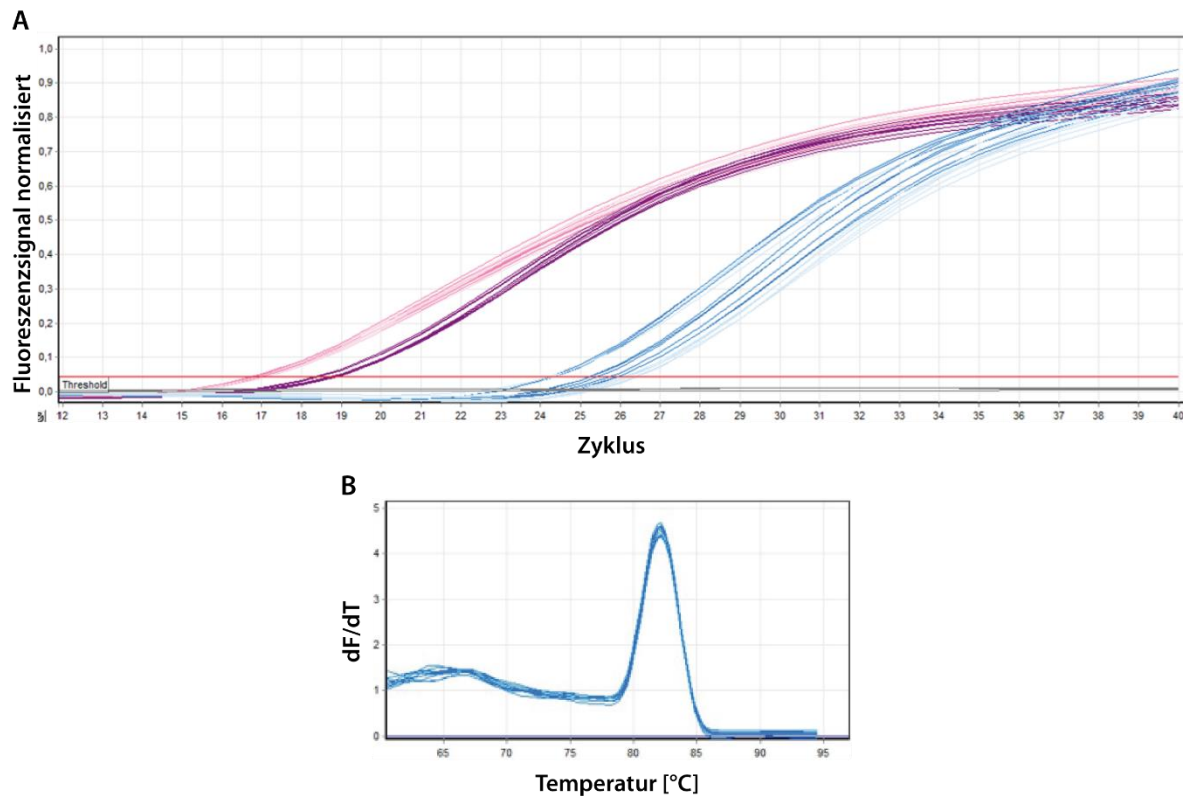


Abbildung 6-3: Fluoreszenzkurven der qPCR. **A**, Auf der y-Achse ist die Intensität des Fluoreszenzsignals und auf der x-Achse die Anzahl der Zyklen abgebildet. Die unterschiedlich farbigen Kurven stellen verschiedene Ansätze dar. Die rote Linie ist der Schwellenwert, bei Überschreitung wird der C_T -Wert bestimmt. **B**, Ist die Schmelzkurve einer Probe, mit einem Maximum dargestellt. Auf der x-Achse ist die Temperatur und auf der y-Achse die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur (dF/dT).

Formel 6-3: Berechnung der Primer Effizienz (E).

$$E = (10^{\frac{-1}{m}}) - 1 \quad m = \text{Steigung}$$

Neben der Primer Effizienz sollte zusätzlich gewährleistet werden, dass die Primer keine Dimere bilden. Hierfür wurde nach Ende eines qPCR-Programms eine Schmelztemperaturanalyse durchgeführt (Abbildung 6-3 B). Bei diesem Schritt wird die DNA langsam denaturiert, indem die Temperatur kontinuierlich ansteigt. Dieser Schritt ist wichtig, da der Fluoreszenzfarbstoff auch unspezifisch an Primer-Dimere binden könnte. Primer-Dimere hätten allerdings einen viel niedrigeren Schmelzpunkt als die PCR-Produkte und wären in der grafischen Analyse der qPCR-Programme sichtbar (Reineke, 2004).

Nachdem die Effizienz der Primer getestet und die Schmelztemperatur analysiert wurde, konnten die unterschiedlichen Transkripte, die von Interesse waren (GoI „*gene of interest*“), in den Ansätzen näher untersucht werden. Für die qPCR wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix erstellt (Tabelle 6-6).

Tabelle 6-6: Primer Mastermix für die qPCR.

Lösungen	Ansatz
H ₂ O	3,2 µl
Primer FP und RP (10 pmol/µl)	Je 1,4 µl
QuantiNova „SYBR Green“ PCR Master Mix (2x)	10 µl

Jedes untersuchte Transkript einer Probe wurde in einem Lauf dreifach bestimmt. 4 µl des Templates DNA bzw. cDNA wurde in jedes Reagenzgefäß im enthaltenen Mastermix resuspendiert. Die Proben wurden in dem Qiagen Rotor-Gene Q eingesetzt und das Amplifikationsprogramm mit anschließender Schmelztemperaturanalyse konnte gestartet werden.

qPCR-Programm

Initial-Denaturierung	95°C	→ 2 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	→ 5 sec	
Annealing/Elongation	60°C	→ 10 sec	
Schmelztemperaturanalyse	50°C bis 95°C		

Am Ende eines Laufes erfolgte die Auswertung mithilfe des Qiagen Rotor-Gene Programms, hierbei wurde der Schwellenwert in den Wendepunkt der exponentiellen Phase gelegt. Die Zyklen Zahl der Proben, die diesen Schwellenwert überschritten hatten, wurden für die weiteren Analysen verwendet. Die Berechnung der Quantität der GoI in einer Probe erfolgte nach Formel 6-4. Hierfür wurden Haushaltsgene ausgesucht, die sich in den verschiedenen Konditionen, in ihrer Expression nicht oder nur geringfügig unterschieden. Für das relative Expressionsniveau wurden die unterschiedlichen Konditionen bzw. Mutanten auf einen Kontrollwert bezogen. Dieser war entweder die Wildtyp-Situation, Gesamt-RNA oder eine Polysomen-Fraktion. Mithilfe eines Balkendiagramms wurde der log2 des relativen Expressionsniveaus grafisch dargestellt.

Formel 6-4: Quantitative Bestimmungen der Genexpressionen.

$$C_T \text{ Wert GoI} - C_T \text{ Wert Haushaltsgene} = \Delta C_T$$

(1) Kontrolle

(2) Mutante

$$\Delta C_T (2) - \Delta C_T (1) = \Delta \Delta C_T$$

$$\text{für die Kontrolle galt: } \Delta C_T (1) - \Delta C_T (1) = \Delta \Delta C_T = 0$$

$$\text{relatives Expressionsniveau} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Des Weiteren konnte mithilfe der quantitativen PCR die Menge an integriertem Plasmid in der Hefe bestimmen werden. Dies konnte herangezogen werden, um eine identische Menge an

Kontroll-Konstrukt und verändertem Konstrukt zu erhalten. Hierfür wurde DNA der jeweiligen Stämme isoliert. Mithilfe des Aktin-Wertes, welches als Haushaltsgen eingesetzt wurde, erfolgte die Angleichung der isolierten DNA. Nach dem Einsatz der gleichen DNA-Menge konnte mithilfe der Formel 6-4 die Menge des GoI berechnet werden, wobei hier sichergestellt wurde, dass sich die Menge der Kontroll-Situation nicht von der zu untersuchenden Situation unterschied.

6.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA Proben

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- und RNA-Fragmente nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt. Die negativ geladene Nukleinsäure wandert im angelegten elektrischen Feld von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Die Agarosekonzentration entscheidet über die Laufgeschwindigkeit der Proben, wobei kleine Fragmente schneller im Gel wandern als größere (Mülhardt, 2009). Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr), ein UV-Licht absorbierender und sichtbares Licht emittierender Farbstoff, wird die Nukleinsäure unter UV-Licht sichtbar.

Für die Auftrennung von PCR-Produkten wurden je nach Größe ein 1-1,5%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde die abgewogene Agarose mit 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Das flüssige Agarosegel wurde mit 0,2 µg/ml EtBr versetzt, anschließend in eine Kammer (Hoefer) gegossen und ein Kamm für das Aussparen der Probentaschen eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels, konnte es in die Gelkammer (Hoefer HE33), welche mit 1x TBE enthielt, eingesetzt werden. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Des Weiteren wurden 5 µl des Größenstandards „*Gene Ruler DNA Ladder Mix*“ von Fermentas eingesetzt. Das Gel (Gellänge 11 cm) lief bei 90 V etwa 45-60 min und wurde dann unter UV-Licht in dem Geldokumentationssystem von Jena Analytics dokumentiert. Für die Extraktion von bestimmten Banden aus dem Agarosegel, um nichtgewollte Banden zu eliminieren, wurde die Bande unter dem Transluminator XL („*FastGene Blue/Green LED*“) ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktions-Kit von Qiagen (QIAquick siehe Tabelle 7-5) nach Herstellerangaben isoliert. Die aufgereinigten Proben wurden in 30 µl Wasser eluiert.

Neben den PCR-Produkten wurde auch RNA auf ein Gel aufgetragen. Dadurch konnte zu einem die Konzentration ermittelt und zum anderen festgestellt werden, ob die RNA degradiert ist. Zunächst musste die RNA erhitzt werden, um sicherzustellen, dass diese einzelsträngig vorlag. Nach dem Erhitzen wurden 200 ng der RNA mit 6 µl Formamid und 2 µl Probenpuffer versetzt. Die Zugabe des Formamids war notwendig, da dadurch die RNA vor Degradierung durch RNasen geschützt wurde. Das komplette Gemisch wurde auf ein 2%iges Gel aufgetragen. Auch hier wurde der gleiche Größenstandard verwendet, jedoch konnte die Größe der RNA nicht abgelesen werden, da es sich um ein DNA-Größenstandard handelte. Auch hier erfolgte eine Betrachtung unter UV-Licht. War die RNA degradiert, so wurde anstatt einer deutlichen Bande nur ein Schmier sichtbar.

6.2.8 Klonierung

Bei der Klonierung werden zuvor amplifizierte DNA-Fragmente aus dem Hefegenom nach einem Restriktionsverdau in einen Vektor ligiert, anschließend zur Vervielfältigung in *E.coli* transformiert und aus den Bakterien isoliert. Nach Überprüfung der DNA-Sequenz konnte diese nach erneutem Restriktionsverdau in einen Expressionsvektor umklont werden.

6.2.8.1 Restriktionsverdau

Endonukleasen, die für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden, erkennen spezifische, oft palindromische DNA-Sequenzen und schneiden diese vor oder an der Erkennungsstelle. Der Restriktionsverdau wurde zum einen herangezogen um neue Konstrukte, die in die Hefe integriert werden sollten, herzustellen und zum anderen um integrative Plasmide vor einer Hefe Transformation zu linearisieren. Des Weiteren wurden Kontroll-Restriktionsverdaue angesetzt, um zu überprüfen, ob das klonierte Insert im Plasmid vorhanden war. Das Gen, welches in einen Vektor ligiert werden sollte, musste zunächst nach der PCR aufgereinigt werden. Dies erfolgte mithilfe des PCR-Aufreinigungs-Kit von Qiagen, nach Herstellerangaben (siehe Tabelle 7-5). Daraufhin wurden das Plasmid sowie das Insert mit je zwei unterschiedlichen Enzymen geschnitten, um ein Klonieren des Inserts in die richtige Orientierung zu gewährleisten. Folgender Ansatz wurde für die Konstrukt Herstellung für 3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert:

10x Restriktionspuffer	2 µl
DNA	10 µl PCR-Produkt oder 2,5 µg Plasmid
Enzyme (20000 U/ml) je	0,75 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die verdauten Proben wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und die benötigte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

Für einen Kontroll-Restriktionsverdau wurde der folgende Ansatz, welcher 1 h bei entsprechender Temperatur inkubiert, verwendet:

10x Restriktionspuffer	1 µl
DNA	3 µl
Enzyme (20000 U/ml)	0,25 µl
H ₂ O	5,5 µl
Gesamt	10 µl

Nachdem das Konstrukt hergestellt wurde, konnte dieses in die Hefe transformiert werden. Um an einer bestimmten Stelle zu integrieren musste das Plasmid entweder am Markergen oder am tCyc1 (Cytochrome c) geschnitten werden. Der folgende Ansatz wurde für etwa 1 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Außerdem wurde vor der Transformation das verdaute Plasmid mittels Gelelektrophorese überprüft.

10x Restriktionspuffer	3 µl
DNA	2,5 µg
Enzyme (20000 U/ml) je	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die Restriktionspuffer wurden für jedes Enzym gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei einem Doppelverdau wurde darauf geachtet, dass beide Enzyme im selben Puffer schnitten.

6.2.8.2 Ligation

Bei der Ligation wird ein Vektor mit einem Insert durch die Ligase verknüpft. Durch die, nach dem im Restriktionsverdau entstandenen Überhänge, kann das Insert in der richtigen Orientierung in den Vektor ligiert werden. Die aus dem Gel aufgereinigten Produkte, wurden zur Bestimmung der Konzentrationen von Plasmid und Insert erneut auf ein Gel aufgetragen. Für die Ligation wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 5:1 im folgenden Ansatz eingesetzt und für mindestens 3 h bei RT inkubiert.

Insert DNA	5x Überschuss
Vektor- DNA	1 µl
10x T4 Ligationspuffer	1 µl
T4 Ligase (1 U/µl) je	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

6.2.8.3 *E.coli* Transformation Plasmid Präparation und Sequenzierung

Das neu ligierte Plasmid wird für eine schnelle Vervielfachung in Bakterienzellen transformiert. Aufgrund der schnellen bakteriellen Zellteilung, liegt das Plasmid innerhalb von 12 h in größerer Menge vor (Brown et al., 2007). Die Transformation erfolgte über Elektroporation. Die Permeabilität der Zellmembran wird durch Anlegen einer Spannung erhöhte und trägt zur Aufnahme von Fremd-DNA bei (Dower et al., 1988). Die Zugabe eines Antibiotikums ermöglicht eine Selektion der Zellen, die ein ligiertes Konstrukt enthalten. Durch einen Kontrollverdau und anschließender Sequenzierung kann sichergestellt werden, dass es sich um das korrekt ligierte Konstrukt handelte.

Für die Transformation wurde ein elektrokompenter *E.coli* Stamm DH5α mit folgendem Genotyp verwendet:

Stamm	Genotyp
DH5α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)-U169 <i>deoR endA1 gyrA96</i> <i>hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA recA1 relA1 supE44 thi-1 λ</i>

Die Zellen wurden vor der Transformation auf Eis aufgetaut und mit 100 µl Wasser verdünnt. Für einen Ansatz wurde 50 µl entnommen, in eine gekühlte Glasküvette überführt und 5 µl des

dialysierten Ligationsansatzes zugefügt. Unter folgenden Parametern wurde die Elektroporation durchgeführt:

Feldstärke	12,5 kV/cm
Widerstand	200 Ω
Kapazität	25 μ F
Kondensatorspannung	2,5 kV

Die Zellen wurden daraufhin in 37°C warmen SOC Medium überführt und für mindestens 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dies war für die Expression des β -Lactamase-Gens, die für die Ampicillin Resistenz codiert, nötig. Im letzten Schritt erfolgte das Ausplattieren und Selektieren der Zellen. Hierfür wurden die Zellen 1:2 und 1:10 verdünnt, auf eine LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Damit sichergestellt werden konnte, dass die Bakterienzellen das richtige und nicht mutierte Konstrukt enthalten, wurde aus mehreren Kolonien die Plasmid-DNA isoliert, verdaut und sequenziert. Um das Konstrukt zu kontrollieren wurde eine Isolation gewählt die schnell ablief, allerdings viele Verunreinigungen enthielt. Hierfür wurden Einzelkolonien von der Platte in 3 ml LB-Ampicillin-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von jeder Kultur wurde am nächsten Tag 1 ml bei 4°C aufbewahrt, um nach der Kontrolle eine größere Menge an korrektem Konstrukt herzustellen. Die restlichen 2 ml wurden für die Plasmid-Präparation in ein Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 40 μ l Easy-Prep-Puffer (siehe Tabelle 7-2) resuspendiert. Der Ansatz wurde daraufhin 1 min bei 100°C aufgeköcht, anschließend 1 min auf Eis abgekühlt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit (16000 g) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA mithilfe eines Restriktionsverdaus und anschließender Gelelektrophorese überprüft (vgl. 6.2.7, 6.2.8.1), ob das Konstrukt das ligierte Insert enthielt.

Mithilfe der Sanger-Sequenzierung konnte nach erfolgreicher Herstellung des Konstruktes überprüft werden, ob Mutationen im Konstrukt vorhanden waren. Hierfür wurde die zuvor isolierte und kontrollierte Plasmid-DNA, mithilfe des NucleoSpin®-Kit von Macherey-Nagel, (siehe Tabelle 7-5) laut Herstellerangaben über eine Säule aufgereinigt und deren Konzentration bestimmt (vgl. 6.2.3). Für die Sequenzierung wurden 500-1200 ng DNA und 3 μ l Primer (10 μ M) eingesetzt. Der Ansatz wurde dann auf 15 μ l aufgefüllt. Die Firma Seqlab (Göttingen) führte die Sequenzierungen durch, die Auswertung erfolgt mithilfe der „*Bio Edit Sequence Alignment Editor*“ Software (siehe 7.5.2).

Von den überprüften Konstrukten konnte im letzten Schritt eine größere Menge an Plasmid-DNA hergestellt werden. Hierfür wurde die auf 4°C gelagerte Bakterienkultur der richtigen Transformante in 80 ml LB-Ampicillin Medium überführt und erneut bei 37°C über Nacht

inkubiert. Die Präparation erfolgte laut Herstellerangaben vom GenElute™ HP Plasmid-Midi-Kit von Sigma-Aldrich (siehe Tabelle 7-5).

6.3 Proteinanalytische Methoden

Mithilfe von Proteinanalytischen Methoden können Proteine, die von Interesse sind, sowie das gesamte Proteom untersucht werden. In dieser Arbeit wurden spezifische Proteine mithilfe von Immundetektion nachgewiesen und quantifiziert. Mithilfe der Polysomen-Profile konnten mRNAs hinsichtlich ihrer Translationseffizienz untersucht werden. Im folgenden Abschnitt wird auf die unterschiedlichen Methoden näher eingegangen.

6.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus der Hefe

Damit Proteine näher untersucht werden können, müssen diese zunächst isoliert werden. Hierfür wurden Zellen über Nacht angeimpft und bei 25°C inkubiert. Aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurden 10-15 OD₆₀₀ Hefezellen bei 800 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml kaltem Wasser resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen überführt. Zu der Probe wurde 150 µl Lysepuffer (Puffer 3 mit 60 mM β-Glycerolphosphat siehe Tabelle 7-2) zugegeben und die Proben wurden daraufhin in einer Retsch-Mühle für 10 min bei maximaler Frequenz mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden anschließend bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C für 3 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde 50 µl entnommen und mit 50 µl 2x Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 7-2) versetzt. Das Gemisch wurde danach für 10 min bei 100°C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

6.3.2 Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford

Für quantitative Aussagen von bestimmten Proteinen, war es notwendig mit der gleichen Konzentration des gesamten Proteoms weiter zu verfahren. Hierfür wurde eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist, dass Coomassie brilliant blue G 250 an Proteine bindet und sich dadurch das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein) verschiebt (Rehm & Letzel, 2010).

Für die Bestimmung der Konzentration wurde das Proteinlysat 1:1000 in Wasser verdünnt und 1:2 mit dem Bradford-Reagenz versetzt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei RT gefolgt von der photometrischen Messung bei OD₅₉₅. Als Referenzprobe wurde Wasser mit dem Bradford-Reagenz 1:2 verdünnt. Durch Standardkurven in der Arbeitsgruppe konnte ermittelt werden, dass 0,2 OD etwa 5 µg/µl Protein entsprechen.

6.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS („*sodium dodecyl sulfate*“ Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Das SDS sowie das β-Mercaptoethanol denaturieren die Proteine und gleichzeitig wird dadurch eine Protein-Protein-Wechselwirkung vermieden. Die Proteine

binden das SDS im Lämmli-Puffer und werden zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen. Dadurch wird die Wanderung zu Anode unabhängig der Proteineigenladung gewährleistet. Das β -Mercaptoethanol ist für die Reduzierung der Protein-Disulfidbrücken verantwortlich. Durch die Polyacrylamidmatrix im Gel werden die Proteinkomplexe im Wesentlichen nach ihrer Molekülmasse getrennt (Rehm & Letzel, 2010). Für die diskontinuierliche SDS-PAGE werden Gele verwendet, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehen. Hierbei werden die Proteine im großporigen Sammelgel mit einem niedrigeren pH-Wert (6,8) auf eine Bande konzentriert. Dies ermöglicht einen gleichzeitigen Eintritt in das engmaschigere Trenngel (pH-Wert 8,8), in dem die Proteine hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden.

Bevor die Proben beladen werden konnten, musste zuvor das Gel gegossen werden. Hierfür wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten befüllt. Die Glasplatten wurden zuvor mit einem Gummi abgedichtet, welches ein Auslaufen des Gels verhinderte. Durch Übersichtung des Trenngels mit Isopropanol konnte eine glatte Kannte gewährleistet und ein Austrocknen verhindert werden. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel zugefügt. Damit das Gel mit dem Proben beladen werden konnte, wurde ein Kamm, was zur Taschenbildung führte, in das Sammelgel gesetzt. Die Konzentration des Trenngels konnte je nach Proteingröße zwischen 9 und 12% variieren. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in Tabelle 6-7 aufgeführt. Die Proben wurden in jedem Lauf mit der identischen Proteinkonzentration beladen. Sie variierte zwischen 0,5 und 2 OD₅₉₅. Die Auftragsmenge in μ l wurde berechnet, indem die gewünschte OD₅₉₅ durch die gemessenen OD₅₉₅ (vgl. 6.3.2) dividiert wurde. Neben den Proben wurde zusätzlich der Proteinstandard, ColorPlus von NEB aufgetragen (siehe 7.3).

Die Gelelektrophorese lief bei 20-25 mA pro Gel für etwa 1,5 h und wurde gestoppt, sobald die blaue Bande des Lämmli-Puffers aus dem Trenngel lief. Das Trenngel wurde anschließend aus den Glasplatten entnommen und für die Western-Blot-Analyse verwendet.

Tabelle 6-7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gel.

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	9%iges Gel	12%iges Gel	
H ₂ O	2,6 ml	2,6 ml	1,5 ml
Tris/HCl	1,5 ml (pH 8,8)	1,5 ml (pH 8,8)	625 μ l (pH 6,8)
Arcylamid-Mix	1,8 ml	1,8 ml	335 μ l
SDS 10%	60 μ l	60 μ l	25 μ l
APS 10%	36,5 μ l	36,5 μ l	25 μ l
TEMED	3,65 μ l	3,65 μ l	2,5 μ l

6.3.4 Western-Blot und immunologischer Proteinnachweis

Die aufgetrennten Proteine werden beim Blotten vom SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Dadurch wird es möglich, bestimmte Proteine hinsichtlich ihrer Konzentration, auf der Membran zu analysieren. Sie können mittels Antikörper, die entweder direkt gegen das Protein oder gegen einen „Tag“ gerichtet sind, detektiert werden. Die verwendete Membran besteht aus Nitrocellulose und bindet die Proteine über polare Wechselwirkungen. Das elektrisch gerichtete Feld wird senkrecht zum Gel angelegt und die Proteine, die durch das SDS negativ geladen sind, wandern zur Anode (Rehm & Letzel, 2010). Die transferierten Proteine werden im nächsten Schritt mit Antikörper detektiert. Hierbei binden die primären Antikörper spezifisch an die gewünschten Proteine. Die sekundären Antikörper sind gegen das Tier des primären Antikörpers gerichtet und an ihnen ist ein Infrarot Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dieser kann mithilfe des Odyssey Infrared Imagers (LI-CORE) detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein „Semi dry“ Blot für die Western-Analyse verwendet. Hierfür wurde zunächst ein Whatman GB005 Papier, das zuvor in Transferpuffer getränkt wurde auf die Anode der Elektroblopparatur gelegt. Auf das Papier folgte die Nitrozellulosemembran, ebenfalls in Transferpuffer getränkt, dann das gelaufene und in Puffer getränkte Polyacrylamid-Gel. Über das Gel wurde erneut ein im Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier gelegt. Mittels eines Drigalskispatels wurden auf allen Ebenen Luftblasen entfernt. Am Schluss wurde die Kathode draufgelegt. Das Blotten erfolgte bei 40 mA pro Gel für 1,5 -2 h, je nach Größe des zu detektierenden Proteins. Um den gelungenen Transfer der Proteine und die gleichmäßige Protein Beladung auf der Membran zu visualisieren, wurde diese mit PonceauS für 10 min bei RT reversibel gefärbt. Bevor der immunologische Nachweis der Proteine durchgeführt werden konnte, musste die Membran, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu blocken, etwa 1 h bei RT in 5% Milch (Magermilchpulver in TBS-T) inkubiert werden. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C in 5% Milch auf einer Wippe inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 3x 5-minütiges Waschen in TBS-T bei RT. Der sekundäre Antikörper, verdünnt in 5% Milch, wurde anschließend auf die Membran pipettiert und für mindestens 2 h bei RT auf einer Wippe abgedunkelt inkubiert. Vor der Detektion erfolgte ein erneutes Waschen in TBS-T (3x 5 min) und eine Überführung der Membran in TBS. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch die Anregung und Detektion des Infrarot Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpers bei 680 bzw. 800 nm durch den LI-CORE. Die Bilder wurden anschließend bearbeitet und quantifiziert mit der Odyssey Image Studio Software.

6.3.5 Polysomen-Profile

Die Genexpression wird an unterschiedlichen Ebenen reguliert. Eine Form der Regulation kann bei der Translation erfolgen. Um zu messen wie stark eine mRNA aktiv translatiert wird, kann die Methode der Polysomen-Profile herangezogen werden. Diese Methode basiert auf einer Saccharose-Gradienten Zentrifugation, bei der ungebundene mRNAs, sowie mRNAs an die ein oder mehrere Ribosomen gebunden haben, separiert werden. (Chassé et al., 2017). Damit die

Ribosomen auf der mRNA verharren, um den aktiv translatierten Zustand zu erhalten, werden die Zellen zuvor mit Cycloheximid, ein Inhibitor der Translation Elongation, behandelt. Der Gradient wird bei A_{260} nm gemessen und die unterschiedlichen Fraktionen (Anzahl der gebundenen Ribosomen) getrennt. Im darauffolgenden Schritt wird die RNA aus den Fraktionen isoliert und analysiert.

6.3.5.1 Herstellung des Saccharose-Gradienten

Für die Herstellung des Gradienten wurden zuvor Saccharoselösungen mit Konzentrationen von 10-50% hergestellt und anschließend sterilfiltriert. Der Zucker wurde in Lysepuffer (100 mM NaCl; 30 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gelöst und mit 100 μ g/ml Cycloheximid (Chx, Stammlösung 20 mg/ml in EtOH) versetzt. Der Gradient wurde direkt im Zentrifugenröhrchen fertiggestellt. Hierfür wurde zuerst 2,2 ml der 50%igen Zuckerlösung mit Chx pipettiert und bei -80°C für mind. 20 min eingefroren. Auf die eingefrorene Zuckerlösung wurde daraufhin die 40%ige Lösung überschichtet, ebenfalls 2,2 ml, und erneut bei -80°C für min. 20 weggefroren. Somit wurden mit den nächsten, niederprozentigen Zuckerlösungen weiter verfahren. Der Gradient wurde bei -80°C gelagert und am Abend vor der Zentrifugation bei 4°C aufgetaut, wobei Erschütterungen vermieden werden sollten.

6.3.5.2 Lyse der Zellen und Polysomen-Profil

Für die Untersuchung von Polysomen-assoziiierter RNA wurde eine 75 ml Kultur angesetzt. Von der wachsenden Kultur (OD_{600} 0,7) wurde 52,5 OD_{600} bei 1800 g für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml kaltem Lysepuffer mit Chx resuspendiert und in zwei Reaktionsgefäße mit 0,6 g Glasperlen überführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (1800 g für 3 min), der Überstand verworfen und 300 μ l kalter Lysepuffer mit Chx auf das Pellet in dem Reaktionsgefäß mit den Glasperlen pipettiert. Die Zellen im Puffer wurden bei -80°C gelagert. Die Zell-Lysate wurden am gleichen Tag wie das Polysomen-Profil erstellt. Hierfür wurden die Zellen zuerst auf Eis aufgetaut, daraufhin in einer Retsch-Mühle für 10 min bei maximaler Frequenz mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden anschließend bei 2000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Überstände von 2 Reaktionsgefäßen wurden vereint und bei 4000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Damit die gleiche Menge auf die Zuckergradienten beladen wurde, musste zunächst die RNA-Konzentration der Proben bestimmt werden. Hierfür wurden die Proben 1:10 mit Lysepuffer verdünnt, als Referenzwert diente ebenfalls der Lysepuffer. Die Konzentration wurde, wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben, gemessen. 800 μ g RNA wurden auf die zuvor erstellten und aufgetauten Zuckergradienten (6.3.5.1) langsam am Rand des Röhrchens pipettiert. Die Röhrchen wurden mit dem Lysepuffer inklusive Chx austariert und für 3 h bei 35000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge (Thermo Scientific Sorvall WX Ultra Serie, Roter TH641) zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte mittels einer Äkta, wobei die Zentrifugenröhrchen in eine Halterung eingespannt wurden. In der Halterung war eine Kanüle eingebaut aus der 60% Zucker von unten in das Röhrchen hineinfloss und somit die Probe in die Äkta presste (Abbildung 6-4 A). Die ersten Signale am UV-Detektor bei A_{260} nm waren somit

die freien RNAs, die sich in der niedrigsten Zuckerkonzentration befand. Als letztes wurden die mit vielen Ribosomen besetzten mRNAs, welche in der 50%igen Zuckerkonzentration waren, gemessen (Abbildung 6-4 B). Je ein Peak wurde als eine Fraktion gesammelt. Ein Peak konnte sich in mehreren Reaktionsgefäßen á 500 µl aufteilen. Bevor die Reaktionsgefäße eines Peaks vereinigt werden konnten, wurden diese zuerst über Nacht mit 3-fachem Volumen an 100%-igem EtOH gemischt und präzipitiert.

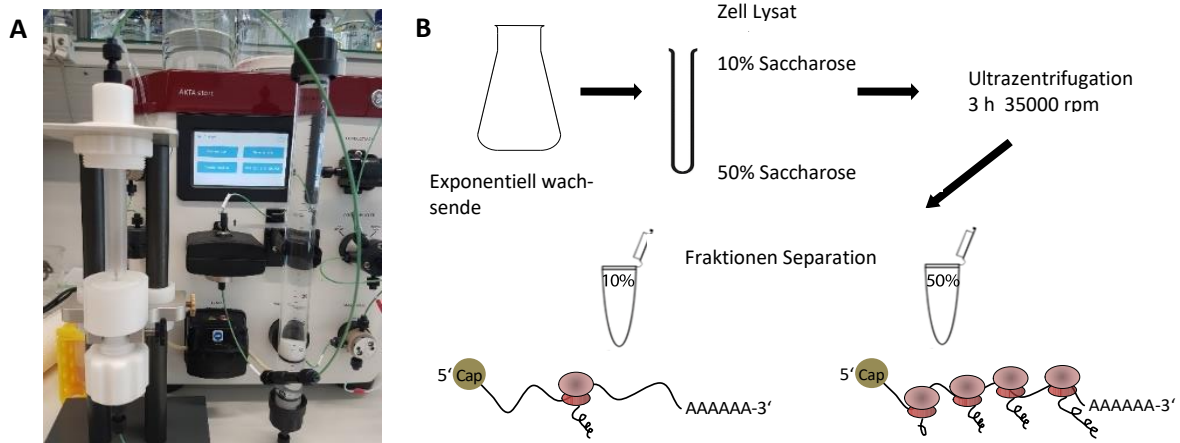


Abbildung 6-4: Generierung der Polysomen-Profile. **A**, Verwendete Äkta mit Halterung (selbst hergestellt durch Werkstatt) für die Auftrennung der Polysomen-besetzten mRNAs. Im 50 ml Loop ist eine 60%ige Zuckerlösung enthalten, die von unten in das Zentrifugenröhrchen gedrückt wurde. Oben aus dem Zentrifugenröhrchen konnte dann die Probe in das System laufen und bei A_{260} nm gemessen werden. Am Bildschirm waren die Peaks zu erkennen, diese wurden daraufhin vereinzelt **B**, Schematische Darstellung des Versuches. Zellen wurden exponentiell angezogen, nach der Lyse auf einen Gradienten überführt, zentrifugiert und aufgetrennt. In der geringeren Zuckerkonzentration befanden sich mRNAs, an denen nur wenige Ribosomen (rosa) gebunden haben. Wohingegen in dem höher prozentigen Zucker mehrere Ribosomen an der mRNA assoziiert vorlagen.

Am nächsten Tag erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde verworfen, das erste Reaktionsgefäß in 200 µl TES Puffer resuspendiert und in das nächste Reaktionsgefäß derselben Fraktion überführt. Dies wurde solange wiederholt, bis alle aus einer Fraktion vereint waren. Zu dem TES wurden 200 µl Phenol gegeben, kräftig gemischt und die Lösung 5 min auf Eis inkubiert und daraufhin 5 min bei 4°C maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere, wasserhaltige Phase, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Chloroform hinzugefügt und wiederholt bei 16000 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Um die RNA aus der Lösung zu präzipitieren wurde die komplette obere Phase abgezogen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500 µl kalter 100%iger Ethanol und 20 µl Natriumacetat (3 M pH 5.3) zugefügt und gut gevortext. Die weiteren Schritte, Präzipitation, liefen analog zu Kapitel 6.2.2, mit dem Unterschied, dass die RNA in 30 µl DEPC-Wasser gelöst wurde. Auch hier erfolgte eine Konzentrationsbestimmung und ein RNA Gel (vgl. 6.2.3, 6.2.7). Weitere Analysen waren qPCR (vgl. 6.2.6.4) sowie RNA-Sequenzierung (siehe 6.4).

6.4 RNA-Sequenzierung und Auswertung

Für die RNA-Sequenzierung wurde die RNA, Gesamt- und polysomal, auf 50 ng/μl in 50 μl DEPC-Wasser verdünnt und zum KFB Regensburg (Kompetenzzentrum Fluoreszenz Bioanalytik) gebracht. Laut den Angaben vom KFB wurde zunächst 300 ng RNA für die PolyA- Aufreinigung, mithilfe von Poly-T Oligos, die an magnetischen „Beads“ assoziiert vorlagen, verwendet. Daraufhin wurde die mRNA in 200-400 Basen fragmentiert. Die Stücke wurden im nächsten Schritt in cDNA „reverse“, durch zufällige hexamere Oligonukleotide, transkribiert. Eine cDNA des zweiten Strangs mit „Blunt“-Enden wurde mithilfe der DNA-Polymerase I und dUTP-Nukleotide synthetisiert. RNaseH wurde ebenfalls beigelegt. Durch die dUTPs kann der zweite Strang in der nachfolgenden PCR nicht abgelesen werden. An die cDNA-Fragmente wurden daraufhin am 3'-Ende adenylierte Index-Adapter ligiert und durch eine PCR-Anreicherung, die cDNA „Library“, präpariert. Durch das „KAPA SYBR FAST ABI Prism Library“-Quantifizierungs-Kit konnte die Library quantifiziert werden. Äquimolare Mengen jeder Library wurden für die Cluster-Erzeugung auf dem cBot (TruSeq SR Cluster Kit v3) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte über den HiSeq1000 mit dem 50 „single reads“ Protokoll und dem TruSeq SBS v3 Kit.

Die Rohdaten, bcl-Dateien, die in fastq-Dateien mithilfe der bcl2fastq v2.18 Software konvertiert wurden, konnten dann bearbeitet werden. Dies erfolgte durch Gerhard Lehmann (Arbeitsgruppe Prof. Meister) und Uwe Schwartz (Arbeitsgruppe Prof. Längst). Hier wurde zunächst die Annotationen des Hefegenom aus den Datenbanken „ensemble“ und „yeastgenome.“ geladen. Die Proben wurden daraufhin hinsichtlich ihrer Qualität analysiert. Durch das Mapping mit der „binary alignment map“ wurde untersucht, ob und wie oft die „Reads“ im Genom „alignen“, wobei größer als 95% erstrebenswert war. Durch „HT-Seq“ wurde die Menge der „Reads“ für jedes Gen gezählt, um am Ende eine quantitative Aussage treffen zu können. Mithilfe von DeSeq2, Skripte stehen online zur Verfügung, konnte die statistische Auswertung inklusive Normierung (basierend auf eine negative binominal Verteilung (Anders & Huber, 2010)) durchgeführt werden. Für die grafische Darstellung der normierten Werte wurde „R-Studio“ und „GraphPad Prism 8“ herangezogen. Zusätzlich wurde eine Gene-Ontology-Analyse durchgeführt, hierfür wurden gefilterte Daten in die PANTHER Datenbank eingespeist (<http://geneontology.org/>) (Mi et al., 2019). Die Tabellen mit den ausgewerteten Daten sind auf der beigelegten CD angehängt (siehe Anhang 10.1).

7 MATERIAL

7.1 Medien, Puffer & Lösungen

Tabelle 7-1: Medien für die Anzucht von Bakterien- und Hefestämme.

Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium autoklaviert	Bacto Typton,	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	300 µl (1 M)/l
SOC-Medium sterilfiltriert	Bacto Typton,	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM
Hefestamm-Anzucht		
Vollmedium (XY), autoklaviert Anzucht Hefe	Bacto Peton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Adenin	0,1 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	Zucker	20 g/l
Selektivmedium, autoklaviert	Yeast Nitrogen Base (10x)	100 ml/l
	Dropout -5 (10x)	100 ml/l
	Zucker	20 g/l
	Nukleobase bzw. Aminosäuren nach Bedarf	
	Adenin (5 g/l)	50 mg/l
	Histidin (5 g/l)	50 mg/l
	Leucin (10 g/l)	100 mg/l
	Tyrptophan (10 g/l)	100 mg/l
Prä-Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Uracil (2,5 g/l)	50 mg/l
	Bacto Peton	3 g/l
	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Adenin	50 mg/l
Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Glukose	100 g/l
	Dropout ++ (10x)	10 ml/l
	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Glukose	0,5 mg/l
	Kaliumacetat	10 g/l

Novozymmedium (sterilfiltriert)	Sorbitol	1 M
	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Frisch zugeben, 14 Tage bei 4°C haltbar	
	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml

Für Hefe Vollmedium und Selektivmedium wurden unterschiedliche Zuckerlösungen verwendet. Folgende Zucker-Stammlösungen wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert: 20% Glukose, 20% Galaktose, 20% Saccharose und 10% Raffinose. Für die Herstellung von Agarplatten wurde zu den Medien 1,7% (w/v) Bacto Agar zugegeben. Um Bakterien zu selektieren, erfolgte eine Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml in 50% EtOH). Die Hefe wurde entweder auf Selektivmedium ohne Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan oder Uracil, je nach Auxotrophiemarker, angezogen. Eine weitere Möglichkeit der Hefeselektion war die Zugabe von Toxinen wie G418 (200 mg/ml), in der Konzentration von 500 µg/ml (W303) bzw. 200 µg/ml (S288C), clonNAT in einer Konzentration von 100 µg/ml oder Hygromycin (50 mg/ml) in der Endkonzentration von 0,24 mg/ml.

Tabelle 7-2: Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung	
DEPC-Wasser	DEPC (durch autoklavieren inaktiv)	0,01% (v/v)
Dropout -5 (10x) (sterilfiltriert)	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoessäure	50 mg/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1 g/l
	Threonin	1 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1 g/l

Dropout ++ (10x)	Dropout -5 (10x)	
	Adenin	500 mg/l
	Histidin	500 mg/l
	Leucin	1000 mg/l
	Tryptophan	1000 mg/l
	Uracil	500 mg/l
Easy-Prep-Puffer (EP) bei -20°C lagern	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	150 mg/ml
	Lysozym	2 mg/l
	RNaseA	0,2 mg/ml
	BSA	0,2 mg/ml
Koloniepuffer (10x)	Tris/HCl pH 8,5	125 mM
	KCl	560 mM
	MgCl ₂	15 mM
Lämmli Auftragspuffer (LSB, 2x)	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	10%
Lysepuffer (Polyso- men-Profil)	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	30 mM
	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	Cycloheximid (20 mg/ml in EtOH)	100 µg/ml
ONPG	ONPG	4 mg/ml
	Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	0,1 M
PonceauS	PonceauS	1 g/l
	Eisessig	5%
Proteinase K	Proteinase K	10 mg/ml
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	Calciumacetat	1 mM
Puffer 3	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	Igepal CA-630	0,1%
	β-Glycerolphosphat	60 mM

RNaseA	RNaseA	10 mg/ml
	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
TAE (50x)	Tris-Base	2 M
	EDTA	50 mM
	→ pH 8 mit Eisessig einstellen	
TBS (10x)	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	→ pH 7,6 mit HCl einstellen	
TBS-T	TBS (10x)	100 ml/l
	Tween 20	0,1%
TE (10x)	Tris/HCl pH 7,5	100 mM
	EDTA	10 mM
TES (DNA Isolation)	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	EDTA	20 mM
	SDS	1%
TES (RNA Isolation)	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	0,5%
	Mit frischem DEPC-Wasser auffüllen und autoklavieren	
Transferpuffer	Glycin	2,9 g/l
	Tris-Base	5,8 g/l
	SDS (10%)	3,7 ml/l
	Methanol	100 ml/l
Turbo LRB (10x)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	9,46 M
	SDS	10 g/l
YNP (10x)	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-Mercaptoethanol frisch dazugeben	50 mM

7.2 Nukleinsäuren, Enzyme und Kits

Tabelle 7-3: Verwendete Nukleinsäuren.

Nukleinsäuren	Hersteller
dNTPs	New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRuler™ DNA Längenstandard	Fermentas International Inc., Burlington (Canada)
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 7-4: Verwendete Enzyme und die Hersteller.

Enzyme	Hersteller
KOD-Hot Start DNA-Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd (Dänemark)
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Restriktionsendonukelasen	New England Biolabs, Ipswich (USA)
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq DNA-Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck

Tabelle 7-5: Verwendete Kits und die Hersteller.

Name	Hersteller
GenElute™ HP Plasmid-Midi-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NucleoSpin® Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
QIAquick Gel-Extractions-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR-Purifications-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiNova Reverse-Transkriptions-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiNova „SYBR Green“ PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
D-Glukose-Assay-Kit	Megazym Ltd., Bray Irland

7.3 Proteine

Proteine wurden mithilfe von SDS-Gelen aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde der Proteinmarker Color Plus von New England Biolabs, Ipswich (USA) herangezogen. Um verschiedene Proteine nachweisen zu können, wurden die Antikörper aus Tabelle 7-6 verwendet. Die Detektion des Infrarot Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpers erfolgte bei 680 bzw. 800 nm durch den LI-CORE mit dem Licor.

Tabelle 7-6: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Name	Verdünnung	Beschreibung, Hersteller
Primäre Antikörper		
α -FLAG (M2)	1:20000	Monoklonaler AK (aus Maus) gegen das FLAG Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
α -GFP (mAB)	1:2000	Monoklonaler AK (aus Maus) gegen GFP; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
α -HA (12CA5)	1:50	Monoklonaler AK (aus Maus) gegen das ha-Epitop (Field et al., 1988)
α -MYC (9E10)	1:100	Monoklonaler AK (aus Maus) gegen das c-MYC-Epitop (Evan et al., 1985)
α -Tubulin2	1:5000	Polyklonales Kaninchenserum gegen β -Tubulin (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln)
Sekundäre Antikörper		
α -Maus-IRDye® 800	1:15000	Sekundäre AK (aus Ziege); LI-COR Biosciences, Bad Homburg
α -Maus-IRDye® 680	1:15000	
α -Kaninchen-IRDye® 800	1:15000	
α -Kaninchen-IRDye® 680	1:15000	

7.4 Hefestämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 7-7: Verwendete und hergestellte Hefestämme. Stämme wurden entweder selbst hergestellt oder waren in der Stammsammlung (Sammlung) von der Arbeitsgruppe Wolfgang Seufert vorhanden. SH: Stammhintergrund, Abb.: Abbildung

Stamm	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle	Abb.
BY4741 BY4742 BY4743	a α a/ α	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	S288c	Brachmann <i>et al.</i> , 1998)	
K699 K700 K842	a α a/ α	<i>ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung	
W15595 W15596	α a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit	
W12996	a/ α	<i>IMT1/ imt1Δ::loxP-LEU2(K.I.)-loxP</i> <i>IMT2/ imt2Δ::hphNT1</i> <i>IMT3/ imt3Δ::natNT2</i> <i>IMT4/ imt4Δ::loxP-his5+(S.p.)-loxP</i>	S288c	Sammlung	4-1
W13036 W13037	a α	<i>imt2Δ::hphNT1 imt3Δ::natNT2</i> <i>imt4Δ::loxP-his5+(S.p.)-loxP</i>	S288c	Sammlung	4-1- 4-3, 4-5, 4-8- 4-13
W15565	a/ α	<i>GCD11/gcd11-Δ521-kanMX6</i>	W303	Sammlung	4-1
W15566 W15567	a α	<i>gcd11-Δ521-kanMX6</i>	W303	Sammlung	4-1- 4-5, 4-8, 4-12, 4-13
W15640	a	<i>imt4Δ::loxP-his5+(S.p.)-loxP</i> <i>imt3Δ::loxP-URA3(K.I.)-loxP</i>	W303	Sammlung	4-1
W15696	α	<i>imt2Δ::natNT2</i>	W303	Sammlung	4-1
W15766 W15778	a α	<i>imt4Δ::loxP-his5+(S.p.)-loxP</i> <i>imt3Δ::loxP-URA3(K.I.)-loxP</i> <i>imt2Δ::natNT2</i>	W303	diese Arbeit	4-1- 4-3, 4-5, 4-8, 4-12- 4- 14, 4-17, 4-24
W15904	a/ α	<i>GCD11/gcd11-Δ521-kanMX6</i>	S288c	Sammlung	4-1
W15905 W15906	a α	<i>gcd11-Δ521-kanMX6</i>	S288c	Sammlung	4-1- 4-3
W16248 W16249	a α	<i>cdc123-Δ325-HA3-HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit	4-1- 4-3, 4-5
W18100	a	<i>GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-2

W18101	a	<i>cdc123-Δ326-HA3- HIS3MX6 GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-2
W18102	a	<i>gcd11-Δ521-GFP(S65T)- HIS3MX6GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-2
W18103	a	<i>imt4Δ::loxP-bis5+(S.p.)-loxP imt3Δ::loxP-URA3(K.I.)-loxP imt2Δ::natNT2 GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-2
W18104	a	<i>GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	S288c	diese Arbeit	4-2
W18105	a	<i>cdc123-Δ325-HA3HIS3MX6GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	S288c	diese Arbeit	4-2
W18106	a	<i>Δ521-GFP(S65T)-HIS3MX6GCN4 FLAG12-kanMX6 gcd11-</i>	S288c	diese Arbeit	4-2
W18107	a	<i>imt3Δ::natNT2 imt4Δ::loxP-HIS3(S.p.)-loxP GCN4 FLAG12-kanMX6</i>	S288c	diese Arbeit	4-2
W14785	a	<i>gcn4Δ::natNT2</i>	W303	Sammlung	4-3
W15485 W15486	a α	<i>imt2Δ::hphNT1 imt3Δ::natNT2 imt4Δ::loxP-bis5+(S.p.)-loxP gcn4Δ::kanMX4</i>	S288c	Sammlung	4-3, 4-8, 4-10- 4-13
W15842	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 gcn4Δ::natNT2</i>	W303	Sammlung	4-3
W9056 W9057	a α	<i>gcn4Δ::kanMX4 MET15 LYS2 trp-</i>	S288c	Sammlung	4-3, 4-8, 4-10- 4-13
W15755	a	<i>gcd11-Δ521-kanMX6 bis3::pSIC1-SIC1-GFP-tCYC1-HIS3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung	4-4
W15831	a	<i>tCYC::pSIC1-SIC1-GFP-tCYC-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP</i>	W303	diese Arbeit	4-4, 4-7
W15833	a	<i>cdc123-Δ326-HA3- HIS3MX6 tCYC::pSIC1-SIC1-GFP-tCYC-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-4
W15844	a	<i>ura3::pSIC1-SIC1-GFP-tCYC-URA3 bis3Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYCC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit	4-4

W15845	a	<i>imt2Δ::hphNT1 imt3Δ::natNT2</i> <i>imt4Δ::loxP-bis5+(S.p.)-loxP</i> <i>ura3::pSIC1-SIC1-GFP-tCYC-URA3</i> <i>his3Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYCC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit	4-4
W15373	α	<i>ura3::pTEF2-GFP-SSO1-tCYC1-URA3</i> <i>his3Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYCC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit	4-5
W15379	α	<i>imt2Δ::hphNT1 imt3Δ::natNT2</i> <i>imt4Δ::loxP-bis5+(S.p.)-loxP</i> <i>ura3::pTEF2-GFP-SSO1-tCYC1-URA3</i> <i>his3Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYCC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit	4-5
W15769	a	<i>gcd11-Δ521-kanMX6 ura3::pTEF2-GFP-SSO1-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung	4-5
W15827	a	<i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pTEF2-GFP-SSO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-5, 4-7
W15829	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i> <i>pTEF2-GFP-SSO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-5
W16807	a	<i>ura3::pTEF2-PRE-Seq.-GFP-tCYC-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-15
W16808	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>ura3::pTEF2-PRE-Seq.-GFP-tCYC-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-15
W18082	a	<i>hap4Δ::LEU2 ura3::pTEF2-PRE-Seq.-GFP-tCYC-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-15
W18083	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>hap4Δ::LEU2 ura3::pTEF2-PRE-Seq.-GFP-tCYC-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-15
W17397	a	<i>ura3::HAP4-5'UTR GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17399	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>ura3::HAP4-5'UTR GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16

W17402	a	<i>ura3::HAP4-5'UTR (82 AS vor Start CUG →TAG) -tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17404	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 ura3::Hap4-5'UTR (82 AS vor Start CUG →TAG) GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17407	a	<i>ura3::HAP4-5'UTR (19 AS vor Start AUG →TAG) GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17409	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 ura3::HAP4-5'UTR (19 AS vor Start AUG →TAG) GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17412	a	<i>ura3::HAP4-5'UTR ((82 AS vor Start CUG →TAG) (19 AS vor Start AUG →TAG)) GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17414	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 ura3::HAP4-5'UTR ((82 AS vor Start CUG →TAG) (19 AS vor Start AUG →TAG)) GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17884	a	<i>HAP4-FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17886	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 HAP4-FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17888	a	<i>HAP4-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W17890	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 HAP4-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-16
W16757	a	<i>MIG1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-18
W16759	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 MIG1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-18
W18340	a	<i>MIG1-FLAG12-kanMX6</i>	W303	Sammlung	4-18
W18342	a	<i>Δ326-HA3-HIS3MX6 MIG1-FLAG12-kanMX6 cdc123-</i>	W303	Sammlung	4-18
W18343	a	<i>MIG1-FLAG6-kanMX6</i>	W303	Sammlung	4-18

W18845	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>MIG1-FLAG6-kanMX6</i>	W303	Sammlung	4-18
W17851	a	<i>mig1Δ::kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-19, 4-20
W17853	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>mig1Δ::kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-19, 4-20
W16736	a	<i>snf1Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-20, 4-22, 10-6
W16771	a	<i>snf1Δ::LEU2 MIG1-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-20
W16772	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>snf1Δ::LEU2 MIG1-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-20
W16774	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>snf1Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-20
W18411	a	<i>snf1Δ::LEU2 mig1Δ::kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-20
W18412	a	<i>Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>snf1Δ::LEU2 mig1Δ::kanMX6</i> <i>cdc123-</i>	W303	diese Arbeit	4-20
W17848	a	<i>reg1Δ::kanMX6 MIG1-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-21
W18087	a	<i>REG1 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-21
W18089	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>REG1 FLAG12-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-21
W18092	a	<i>reg1Δ::kanMX6 snf1Δ::LEU2</i> <i>MIG1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-</i> <i>mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-21
W16737	α	<i>snf1Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-22
W16775	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>snf1Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-22
W17847	a	<i>reg1Δ::kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-22

W18091	a	<i>reg1Δ::kanMX6 snf1Δ::LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-22
W18093	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 reg1Δ::kanMX6 snf1Δ::LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-22
W18352	a	<i>natNT2-pMET25-3xHA-REG1</i>	W303	Sammlung	4-23
W18354	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 natNT2-pMET25-3xHA-REG1</i>	W303	Sammlung	4-23
W18361	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 natNT2-pTEF2-3xHA-REG1</i>	W303	Sammlung	4-23
W18363	a	<i>natNT2-pTEF2-3xHA-REG1</i>	W303	Sammlung	4-23
W18408	α	<i>natNT2-pTEF2-3xHA-REG1 MIG1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-23
W18409	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 natNT2-pTEF2-3xHA-REG1 MIG1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-23
W17189	a	<i>HXK2-GFP-kanMX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17191	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 HXK2-GFP-kanMX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17194	a	<i>HXK2-3HA-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17199	a	<i>imt4Δ::loxP-his5+(S.p.)-loxP imt3Δ::loxP-URA3(K.I.)-loxP imt2Δ::natNT2 HXK2-3HA-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17201	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 HXK2-3HA-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17204	a	<i>hxxk2Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-25-4-27
W17211	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 hxxk2Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	4-25
W17808	a	<i>tps1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-26

W17810	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>tps1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-26
W17835	a	<i>pfk2Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-26, 4-27
W18033	a	<i>pfk2Δ::NATMX4 tps1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-26
W18120	a	<i>hxxk2Δ::LEU2 tps1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-26
W17733	a	<i>PFK1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17829	a	<i>pfk1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17831	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>pfk1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17834	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>PFK1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17836	a	<i>PFK2-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17837	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>pfk2Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17837	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>PFK2-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17902	a	<i>hxxk2Δ::LEU2 pfk2Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W17904	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>hxxk2Δ::LEU2 pfk2Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	4-27
W16630	a	<i>ras2Δ::TRP1</i>	W303	Sammlung	4-28
W16649	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>ras2Δ::TRP1</i>	W303	Sammlung	4-28
W17580	a	<i>trp1::pRAS2-RAS2-tRAS2-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-28
W17584	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>trp1::pRAS2-RAS2-tRAS2-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-28
W17589	a	<i>trp1::pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-28

W17593	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 trp1::pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2- TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-28
W16542	a	<i>tyc1::pTEF2-FLAG-PDE2-tCYC- LEU2</i>	W303	Sammlung	4-29
W16547	a	<i>pde2Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung	4-29
W16620	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 tyc1::pTEF2-FLAG-PDE2-tCYC- LEU2</i>	W303	Sammlung	4-29
W16624	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 pde2Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung	4-29
W17566	a	<i>leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17568	a	<i>leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17575	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2 ras2Δ::TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17577	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2 ras2Δ::TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17582	a	<i>leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2 trp1::pRAS2-RAS2- tRAS2-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17586	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 trp1::pRAS2-RAS2-tRAS2-TRP1 leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2-200)- tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17591	a	<i>trp1::pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2- TRP1 leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2- 200)-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17595	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 trp1::pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2- TRP1 leu2::pTEF2-HA4-CKI1 (2- 200)-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17597	a	<i>trp1::pTEF2-HA4-CKI1(2-200)- tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	
W17598	a	<i>pde2Δ::LEU2 trp1::pTEF2-HA4- CKI1(2-200)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30

W17600	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 pde2Δ::LEU2 trp1::pTEF2-HA4- CKI1(2-200)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17602	a	<i>tyc1::pTEF2-FLAG-PDE2-tCYC- LEU2 trp1::pTEF2-HA4-CKI1(2- 200)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17604	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 tyc1::pTEF2-FLAG-PDE2-tCYC- LEU2trp1::pTEF2-HA4-CKI1(2- 200)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-30
W17174	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung	4-31, 10-8
W17182	a	<i>CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung	4-31- 4-36, 10-8
W17739	a	<i>PGK1-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W17740	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 PGK1-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W18010	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 TDH3-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W18012	a	<i>TDH3-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W18015	a	<i>ENO2-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W18021	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 ENO2-GFP-URA3 trp1::pTEF2- mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-31
W17682	a	<i>gcn4Δ::natNT2 CDC19-GFP- URA3trp1::pTEF2-mCherry-SWI5- S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-32, 10-8
W17683	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6 gcn4Δ::natNT2 CDC19-GFP- URA3trp1::pTEF2-mCherry-SWI5- S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-32, 10-8
W17728	α	<i>snf1Δ::LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A- tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Ar- beit	4-33

W17854	a	<i>mig1Δ::KanMX6 CDC19-GFP-URA3</i>	W303	diese Arbeit	4-33
W18410	a	<i>leu2::pTEF2-GFP-SNF1-tCYC1-LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-33
W18413	a	<i>reg1Δ::KanMX6 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-33
W17671	α	<i>pde2Δ LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-34, 10-8
W17673	a	<i>ras2Δ::TRP1 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-34, 10-8
W17680	a	<i>tcyc1::pTEF2-FLAG-PDE2-tCYC-LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-34, 10-8
W17727	α	<i>trp1::pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS2-TRP1 Cdc19-GFP-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit	4-34
W17675	a	<i>hxxk2Δ::LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-35, 10-8
W17832	a	<i>pfk1Δ::KanMX6 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-35
W17838	α	<i>pfk2Δ::KanMX6 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-35
W17879	a	<i>tcyc1::pTEF2-FLAG3-HXK2-tCYC1-LEU2 CDC19-GFP-URA trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-35
W17678	a	<i>tcyc1::pTEF2-FLAG3-HAP4-tCYC1-LEU2 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-37, 10-8

W17679	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>tyc1::pTEF2-FLAG3-HAP4-</i> <i>tCYC1-LEU2 CDC19-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-37
W17882	a	<i>hap4Δ::LEU2 CDC19-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-37
W17883	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>hap4Δ::LEU2 CDC19-GFP-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	4-37
W17367	a	<i>hap4Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W17369	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>hap4Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W17390	a	<i>tyc1::pTEF2-FLAG3-HAP4-</i> <i>tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W17392	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>tyc1::pTEF2-FLAG3-HAP4-</i> <i>tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W16740	a	<i>SNF1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-</i> <i>mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W18084	a	<i>tyc1::pTEF2-FLAG3-Hap4-tCYC1-</i> <i>LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-</i> <i>S/A-tCYC1-TRP1 ura3::pTEF2-</i> <i>PRE-Seq.-GFP-tCYC URA3</i>	W303	diese Arbeit	10-5
W16742	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>SNF1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-</i> <i>mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	10-6
W17362	a	<i>MAF1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-</i> <i>mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	10-7
W17364	a	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>MAF1-GFP-URA3 trp1::pTEF2-</i> <i>mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	10-7
W17858	α	<i>maf1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	10-7
W17859	α	<i>cdc123-Δ326-HA3-HIS3MX6</i> <i>maf1Δ::KanMX6</i>	W303	diese Arbeit	10-7

W17640	a	<i>bmo1Δ::kanMX4 CDC19-GFP-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit	10-8
W17677	a	<i>CDC19-GFP-URA3 pTPI1-PRE-Seq.-mCherry-tCYC-LEU2</i>	W303	diese Arbeit	10-8
W17730	a	<i>pSPC42-SPC42-mcherry-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 ura3::CDC19-GFP-URA3</i>	W303	diese Arbeit	10-8

Tabelle 7-8: Verwendete und hergestellte Plasmide. Plasmide wurden entweder für eine PCR-Amplifikation oder zum Herstellen von neuen Konstrukten herangezogen.

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Quelle
	pBlueskript II (pBS) KS+	<i>E.coli</i> Klonierungsvektor (Alting-Mees & Short, 1989)	Sammlung
	pUG73	<i>LEU2</i> (Gueldener et al., 2002)	Sammlung
	pFA6a-	<i>GFP(S65T)-kanMX6</i> (Longtine et al., 1998)	Sammlung
	pFA6a	<i>3HA-kanMX6</i> (Longtine et al., 1998)	Sammlung
	pFA6	<i>kanMX6</i> (Longtine et al., 1998)	Sammlung
pAG25	pFA6a	<i>natNT2</i> (Goldstein & McCusker, 1999)	Sammlung
pKT209	pFA6a-link	<i>yEGFP-CaURA3</i> (Sheff & Thorn, 2004)	Sammlung
pWS1429	YCp50 (ARS/CEN/URA)	<i>GCN4-Leader</i> Sequenz mit 4 uORFs fusioniert vor <i>lacZ</i> . (Mueller & Hinnebusch, 1986)	Sammlung
pWS2222	pFA6a	<i>FLAG12-kanMX6</i> (Longtine et al., 1998)	Sammlung
pWS2777	pRS305	<i>pTEF2-GFP-tCYC1</i>	Sammlung
pWS3396	pRS315 (ARS/CEN, LEU2)	<i>GCN4-Leader</i> Sequenz mit 4 uORFs fusioniert vor <i>lacZ</i> . Umklontiert von (Mueller & Hinnebusch, 1986))	Sammlung
pWS5462	pRS306	<i>pTIR1-GFP-SWI5-S/A-myc13</i>	Sammlung
pWS5607	pBS KS+	<i>CKI1 (AS 2-200)</i>	diese Arbeit
pWS5660	pRS305	<i>pTEF2-HA4-CKI (2-200)-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung
pWS5672	pRS304	<i>pTEF2-HA4-CKI (2-200)-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung

pWS5685	pBS KS+	<i>HAP4</i>	diese Arbeit
pWS5696	pRS304	<i>pRAS2-RAS2-tRAS2-TRP1</i>	Sammlung
pWS5698	pRS304	<i>pRAS2-RAS2(G19V)-tRAS-TRP1</i>	Sammlung
pWS5732	pRS305	<i>pTEF2-FLAG3-HAP4-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS5758	pBS KS+	<i>HAP4-5'UTR</i>	diese Arbeit
pWS5759	pBS KS+	<i>HAP4-5'UTR</i> (82 AS vor Start CTG → TAG)	diese Arbeit
pWS5760	pBS KS+	<i>HAP4-5'UTR</i> (19 AS vor Start ATG → TAG)	diese Arbeit
pWS5761	pBS KS+	<i>HAP4-5'UTR</i> (82 AS vor Start CTG → TAG und 19 AS vor Start ATG → TAG)	diese Arbeit
pWS5762	pRS306	<i>HAP4-5'UTR GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS5763	pRS306	<i>HAP4-5'UTR</i> (82 AS vor Start CTG → TAG) <i>GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS5764	pRS306	<i>HAP4-5'UTR</i> (19 AS vor Start ATG → TAG) <i>GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS5765	pRS306	<i>HAP4-5'UTR</i> (82 AS vor Start CTG → TAG und 19 AS vor Start ATG → TAG) <i>GFP-SWI5(S/A)-myc13-tCYC1</i>	diese Arbeit
pYM-N20	pYM	<i>pTEF2-HA3 natNT2</i> (Janke et al., 2004)	Sammlung

Tabelle 7-9: Oligonukleotide mit Verwendungszweck.

Oligo	Sequenz (5'→3') und die Verwendung
WS84	TTCCCAGTCACGACGTTG <i>forward</i> -Primer zur Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS85	CACACAGGAAACAGCTATG <i>reverse</i> -Primer zur Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS639	ACAGGGTAATAAAAAAGACGAATATATTCAAATGCGGGTTCTAAAT-GAATTTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer CDC123 Epitop-Markierung in pfa6a System
WS821	ATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAG <i>reverse</i> -Primer zur Überprüfung von Deletionen in pfa6a Systemen
WS826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG Primer zur Paarungstypbestimmung (Huxley et al., 1990)

WS827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG Primer zur Paarungstypbestimmung (Huxley et al., 1990)
WS828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG Primer zur Paarungstypbestimmung (Huxley et al., 1990)
WS2436	CTATCGCCAAGGCTGTCAAGGA <i>reverse</i> -Primer zur Überprüfung von Deletionen in pUG73
WS3032	TACAGCGTCATCTAGCTCCG <i>forward</i> -Primer <i>GCN4</i> qPCR
WS3033	GCTCTTCCACAAACGGCAAC ' <i>reverse</i> -Primer <i>GCN4</i> qPCR
WS3042	TGAGAGTTGCCCCAGAAGAAC <i>forward</i> -Primer <i>ACT1</i> qPCR
WS3043	CGGCTTGGATGGAAACGTAGA <i>reverse</i> -Primer <i>ACT1</i> qPCR
WS3089	ATCACTTGGAAAATGAGGTTGCCAGATTAAAGAAATTAGTT- GGCGAACGCCGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>GCN4</i> Epitop-Markierung in pfa6a System
WS3090	CGTTATACACGAGAATGAAATAAAAAATATAAAATAAAAGGTAAAT- GAAAGAATTTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>GCN4</i> Epitop-Markierung in pfa6a System
WS3179	CGGGGAGATTCGCTTCAAAAGAGCACTCCGAAAATCATGTT- CCACAGGATCGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>CDC123</i> Verkürzung AS 323 in pfa6a Systemen
WS3216	GCGAATTATACAACTCACCAGCC <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>GCN4</i> -Deletionen, vor Start
WS3217	ATTCCACTACAGCGTCATCTAGC <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>GCN4</i>
WS3225	GATTTCGCTTCAAAAGAGCACTCCGAAAATCATGTTCCACAG- GATCTCGTACGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>CDC123</i> Verkürzung AS 325 in pfa6a Systemen
WS3226	TCGCTTCAAAAGAGCACTCCGAAAATCATGTTCCACAGGATCTCG- TAGAACGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>CDC123</i> Verkürzung AS 325 in pfa6a Systemen
WS3286	AGCGTTTCCACTAGCCAACA <i>forward</i> -Primer <i>XBP1</i> qPCR
WS3287	GAGGTGGAGGACGACAACAG <i>reverse</i> -Primer <i>XBP1</i> qPCR
WS3496	AAACATTACCACCCATAAGAAGTTTACCGTTGCCCTTCCCACACATG- GACGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward</i> -Primer <i>MIG1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3497	TTGTCTATTGTCTTTTGATTATCTGCACCGCCAAAAACTTGTCA- GCGTATCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse</i> -Primer <i>MIG1</i> -Epitop-Markierung im pfa6a-link System

WS3555	ATTTAACAACAAAATAATTATGGAATTAGCCGTTAACAGTCA- AAGCAATGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward</i> -Primer <i>SNF1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3556	CGATACATAAAAAAAAAAGGGAACCTCCATATCATTCCTTTTACGTT- CCACCATCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse</i> -Primer <i>SNF1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3559	GAAGTTTTTGTGTAACAAGTTTGCTACACTCCCTTAATAAAGT- CAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC <i>forward</i> -Primer <i>SNF1</i> -Deletion im pUG73-System
WS3560	CGATACATAAAAAAAAAAGGGAACCTCCATATCATTCCTTTTACGTT- CCACCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG <i>reverse</i> -Primer <i>SNF1</i> -Deletion im pUG73-System
WS3561	CGTGATGATGGGACTCGAGAC <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>SNF1</i> -Deletionen, vor Start
WS3562	TTTCTCTTCAATTCTGCCCTGC <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>SNF1</i>
WS3563	CATCGGATCCGTACAAGAATCACGTCCAGGG <i>forward</i> -Primer Klonierung von <i>CKI1</i> AS 2-200, mit BamHI Schnittstelle
WS3564	CTGACTCGAGTTATTCAATGAAAGCCTAGCCAA <i>reverse</i> -Primer Klonierung von <i>CKI1</i> AS 2-200, mit XhoI Schnittstelle
WS3627	TGGCCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAAGTCCGTTGGTATCA- TCGGTGCTCGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>HXK2</i> Epitop-Markierung im pfa6a System
WS3628	GTAGAAAAAGGGCACCTTCTTGTGTGTTCAAACCTAATTTA- CAAATTAAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>HXK2</i> Epitop-Markierung im pfa6a System
WS3631	GTTGTAGGAATATAATTCTCCACACATAATAAG- TACGCTAATTAAATAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC <i>forward</i> -Primer <i>HXK2</i> -Deletion im pUG73-System
WS3632	GTAGAAAAAGGGCACCTTCTTGTGTGTTCAAACCTAATTTA- CAAATTAAGTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG <i>reverse</i> -Primer <i>HXK2</i> -Deletion im pUG73-System
WS3633	AACCTCCTCGCACATTGGTA <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>HXK2</i> -Deletionen, vor Start
WS3634	AATGGCCAAGAAATCACCGG <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>HXK2</i>
WS3639	ATGATGAGAATGTAATAGATGATAAATCAGATCA- AGAAGAATCCCTACAGGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward</i> -Primer <i>MAF1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3640	TAACGATTATAGGTGTAAGACAAGGAAAATTCACAAATTAAAGTT- TAAAATCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse</i> -Primer <i>MAF1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System

WS3662	TCATCGACGACCTTGACGAAGATGTCGATTTTTTAAAGGTACAAG-TATTTGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer HAP4</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3663	TTTGTTTTCGTGATTTTTAGTTGTTTTCGTTTATTGCAACAT-GCCTATTTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer HAP4</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3664	ATTGTGTTTACCTACATTTTCTAG-TACAAAAAAAAAACAACAAAAAGAATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC <i>forward-Primer HAP4-Deletion</i> im pUG73 System
WS3665	TTTGTTTTCGTGATTTTTAGTTGTTTTCGTTTATTGCAACAT-GCCTATTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG <i>reverse-Primer HAP4-Deletion</i> im pUG73 System
WS3666	TGGATTGCTATTTTCTTTCCGAGA <i>forward-Primer</i> zur Überprüfung von <i>HAP4</i> -Deletionen, vor Start
WS3667	TGGATTGCTATTTTCTTTCCGAGA <i>reverse-Primer</i> im intakten <i>HAP4</i>
WS3668	CGGTGCTGGTCACTCCAACACTTTGCAAGTCTCTACCGTTGGT-GACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer CDC19</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3669	AAAAATATAATTCAAAAAATAATATCTTCATTCAATCATGATTCTTT-TTTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer CDC19</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3674	CATCGGATCCATGACCGCAAAGACTTTTCTACTA <i>forward-Primer</i> Überexpression von <i>HAP4</i> , mit BamHI Schnittstelle
WS3675	CTGACTCGAGTCAAAATACTTGTACCTTTAAAAAATC <i>reverse-Primer</i> Überexpression von <i>HAP4</i> , mit XhoI Schnittstelle
WS3691	CATCGAGCTCCGAAACACTGCGGAAGGCGA <i>forward-Primer</i> Klonierung <i>HAP4</i> 5'-UTR, 1250bp vor Start SacI Schnittstelle
WS3692	CATCTCTAGAGGCCTGTAGTAGAAAAAGTCTTTG <i>reverse-Primer</i> Klonierung <i>HAP4</i> 5'-UTR, im ORF, mit XbaI Schnittstelle
WS3693	CCCCAGTTTATATCGTATTAGCTATCTACAGGTCCACTTTAC <i>forward-Primer</i> Mutagenese uORF 1 in <i>HAP4</i> (CTG--> TAG)
WS3694	GTAAAGTGGACCTGTAGATAGCTAATACGATATAAAACTGGGG <i>reverse-Primer</i> Mutagenese uORF 1 in <i>HAP4</i> (CTG--> TAG)
WS3695	GTACATCAAAGAGCATTTTATAGGGTTGCTGATTGTGTTTACC <i>forward-Primer</i> Mutagenese uORF 2 in <i>HAP4</i> (ATG--> TAG)
WS3696	GGTAAACAAATCAGCAACCCTATAAAATGCTCTTTGATGTAC <i>reverse-Primer</i> Mutagenese uORF 2 in <i>HAP4</i> (ATG--> TAG)
WS3697	TCATCGACGACCTTGACGAAGATGTCGATTTTTTAAAGGTACAAG-TATTTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA <i>forward-Primer HAP4</i> Epitop-Markierung im pfa6a System

WS3698	TTTGTGTTTCGTGATTTTTAGTTGTTTCGTTTTATTGCAACAT-GCCATATTGAATTTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse-Primer HAP4</i> Epitop-Markierung im pfa6a System
WS3729	CATATGGTTGCCGGGTAAAGG <i>forward-Primer</i> qPCR RAS2 Integrationshäufigkeit testen
WS3730	AGCTATGACCATGATTACGCCA <i>reverse-Primer</i> qPCR RAS2 Integrationshäufigkeit testen im <i>lacZ</i> vom Plasmid
WS3763	TATTTGGGAAAGCTTTTATATAAAAAATCTGAAACAAAATCATATCA-AAGCGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward-Primer</i> PFK1-Deletion im pfa6a-System
WS3764	ATGCCATTTTACCTCCTTTTGCTTAACTTAAACTTTTCATTGCAAT-CATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse-Primer</i> PFK1-Deletion im pfa6a-System
WS3765	TGTCGTCTACTCAAGTCTCGC <i>forward-Primer</i> zur Überprüfung von PFK1-Deletionen, vor Start
WS3766	AAAGCATCTTTGGAAGTTGGA <i>reverse-Primer</i> im intakten PFK1
WS3767	GTAGATTAAAGTTGAGAGCTGAGGTAGCCGCTTTAGCCGCT-GAAAACAAAGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer</i> PFK1 Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3768	ATGCCATTTTACCTCCTTTTGCTTAACTTAAACTTTTCATTGCAAT-CATTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer</i> PFK1 Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3769	AACTAGATTAGAGACTAGTTTAGCATTTGGCCAAGAACTAACCA-TACGCACGGATCCCCGGGTAAATTAA <i>forward-Primer</i> PFK2-Deletion im pfa6a-System
WS3770	AACATTAATTGACATTAATAATAGAAAGTGTAATAAAAAGGTCATTTT-CITGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse-Primer</i> PFK2-Deletion im pfa6a-System
WS3771	CGCAATGAAGTCTCTCGCTT <i>forward-Primer</i> zur Überprüfung von PFK2-Deletionen, vor Start
WS3772	GGCTTTGGCAGAGATGGATA <i>reverse-Primer</i> im intakten PFK2
WS3773	AAGCTACCAGACTCATTGCTGACCATTTGGTTG-GAAGAAAGAGAGTTGATGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer</i> PFK2 Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3774	AACATTAATTGACATTAATAATAGAAAGTGTAATAAAAAGGTCATTTT-CITTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer</i> PFK2 Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3779	TATTGGAAGGTAAGGAATTGCCAGGTGTTGCTTTCT-TATCCGAAAAGAAAGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer</i> PGK1 Epitop-Markierung im pfa6a-link System

WS3780	GGGAAAGAGAAAAAGAAAAAAAT*TGATCTATCGAT*TTCAATTCAATT- CAATTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse</i> -Primer <i>PGK1</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3786	TGTA ACTACACGAGAGTTGAGTATAGTGGAGACGACATACTACCA- TAGCCCGGATCCCCGGGT*TAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>MIG1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3786	TTGTCTATTGTCT*TTTGAT*TTATCTGCACCGCCAAAAACT*TGTC- GCGTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>MIG1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3787	TGT*TGCCT*TTGAT*TTTCGCGA <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>MIG1</i> -Deletionen, vor Start
WS3788	CTCGAGGGTGGGAGTTTGTA <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>MIG1</i>
WS3791	CAGGCTAACAACTAGGTACTCACATACAGACTTATTAAGACATAG- AACTCGGATCCCCGGGT*TAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>TPS1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3792	AGAGAAAACCGGACCAGGAATAGACGATCGTCTCATTT- GCATCGGGTTCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>TPS1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3793	TGGACAAACTGCACTGAGGT <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>TPS1</i> -Deletionen, vor Start
WS3794	ACCCGACCTTAACGTTTTCG <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>TPS1</i>
WS3795	TTAACCGCTCATTA CTCCAAACGGATT*TTT*TTTGCCTAAAGAATCA- CGACACGGATCCCCGGGT*TAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>MAF1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3796	TAACGATTATAGGTGTAAGACAAGGAAAAATTCACAAATTAAAGTT- TAAAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>MAF1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3797	GAAAGCGCGT*TGTC CATCTT <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>MAF1</i> -Deletionen, vor Start
WS3798	AGCTTGGCACT*TTTGGGAAA <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>MAF1</i>
WS3809	AAATCCTAAAGCAAGCATAT*TGACGAAGACGA- GATAAGAAAAATCCAAAACGGATCCCCGGGT*TAATTAA <i>forward</i> -Primer <i>REG1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3810	ACTACCTGGATT*TTTAT*TTTCTCTTCATGT*TGACTTCAAAAT*CTTT- CTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>reverse</i> -Primer <i>REG1</i> -Deletion im pfa6a-System
WS3811	TTACGAGGGCTAGCT*TTTGG <i>forward</i> -Primer zur Überprüfung von <i>REG1</i> -Deletionen, vor Start
WS3812	GGCAT*TTTCTAACCTAGCAGCA <i>reverse</i> -Primer im intakten <i>REG1</i>

WS3813	CTTGGAAAAAGAGTGACGTCAAGCCACAAGAAAATGGAAAT- GACAGCAGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA <i>forward-Primer MIG1</i> Epitop-Markierung im pfa6a System (<i>reverse</i> 3810)
WS3860	ACGGTTACTCTACCAGAGTTGTCTGACTTGGTTGAACACGTT- GCCAAGGCTGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer TDH3</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3861	AAGCTATAAAAAGAAAATTTATTTAAATGCAAGATTATAAG- TAAATTCACTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer TDH3</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3862	GTGACAAGGCTGTCTACGCCGGTGAAAACCTCCACCACGGT- GACAAGTTGGGTGACGGTGCTGGTTTA <i>forward-Primer ENO2</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3863	ATGATGAAAAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTCT- TAGTTAAAAGCACTTCGATGAATTCGAGCTCG <i>reverse-Primer ENO2</i> Epitop-Markierung im pfa6a-link System
WS3894	TCCTAAAGCAAGCATATTGACGAAGACGA- GATAAGAAAAATCCAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC <i>forward-Primer REG1</i> Epitop-Markierung und Promotor Austausch im pYM-link System
WS3895	TCGTTTTCAATATCTTTCTTACCGGCGAAGTAATTGCTAGATT- GTTGACATCGATGAATTCTCTGTCG <i>reverse-Primer REG1</i> Epitop-Markierung und Promotor Austausch im pYM-link System
WS3896	AAACATTACCACCCATAAGAAGTTTACCGTTGCCCTTCCCACACATG- GACCGGATCCCCGGGTTAATTAA <i>forward-Primer MIG1</i> Epitop-Markierung im pfa6a System (<i>reverse</i> 3497)

7.5 Internetseiten, Software und Makros

7.5.1 Internetseiten für die Primer Herstellung

- <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>
- <http://www.biomers.net/index.html>
- http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <https://www.yeastgenome.org/>
- <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- <http://geneontology.org/>

7.5.2 Software und Datenbanken

Tabelle 7-10: Verwendete Software und Datenbanken.

Name	Hersteller
BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad (USA)
Clone Manager 6	Scientific & Educational Central
FCS Express 4 Flow Research Edition	De Novo Software, Los Angeles (USA)
Gene-Ontology	http://geneontology.org/ (powered by PANTHER)
Illustrator CS4	Adobe Systems Incorporated
Image Studio	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Integrative Genomics Viewer	Broad Institute and the Regents of the University of California
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NCBI Database	www.ncbi.nlm.nih.gov
Photoshop CS2 und CS4	Adobe Systems Incorporated
Prism 8	GraphPad Software, San Diego
R-Studio	RStudio, Inc. Boston
Saccharomyces Genome Database SGD	www.yeastgenome.org
Windows FloMax Software	Sysmex Partec GmbH, Goerlitz
WinMDI 2.8	Joe Trotter

7.5.3 Makros für Image J

Im Folgenden werden zwei Makros aufgelistet, die für die Bearbeitung von Mikroskopiebildern, vom „*Spinning-disk*“, herangezogen wurden. Beim Öffnen einer Datei im Image J liegen die drei aufgenommen Bilder (C0=Durchlicht, C1= *mCherry* und C2= GFP) einzeln im „*Hyperstack*“ vor. Für die Anwendung der Markos war die Grundvoraussetzung, dass die Bilder vor Beginn der Bearbeitung umbenannt wurden (C0=Dic, C1=Rot und C2=GFP).

Makro 1:

Mithilfe dieses Makros wurden Übersichtsaufnahmen bearbeitet. Für jeden Kanal gibt es nur einen Zeitwert mit 16 z-Ebenen. Für die zwei Fluoreszenzkanäle wird nach Abzug des Hinter-

grunds, in einem Bereich, indem sich keine Zellen befinden, eine maximale Projektion durchgeführt. Für das Durchlichtsignal erfolgte eine Projektion der Durchschnittswerte. Die einzelnen Bilder werden daraufhin in ihrem Kontrast bearbeitet, für jedes Protein immer die gleichen Grauwerte, damit die Vergleichbarkeit gegeben war. Daraufhin werden die zwei Fluoreszenzkanäle zusammengelagert. Ein weißer Rand wird an jedes Bild gesetzt, der Typ jedes Bildes in RGB-Color umgewandelt und alle Bilder miteinander kombiniert.

```
selectWindow("GFP");
run("Specify ROI", " width=50 height=50 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("Rot");
run("Specify ROI", " width=50 height=50 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("Dic");
run("Specify ROI", " width=50 height=50 x=0 y=0 slice=1");
run("Synchronize Windows");
selectWindow("Rot");
run("BG Subtraction from ROI", "number=0");
selectWindow("GFP");
run("BG Subtraction from ROI", "number=0");
selectWindow("Dic");
run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
selectWindow("Rot");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
selectWindow("GFP");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
//run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(0, 120);
selectWindow("MAX_Rot");
setMinAndMax(0, 200);
run("Merge Channels...", "c1=MAX_Rot.tif c2=MAX_GFP.tif create keep");
run("RGB Color");
selectWindow("Composite (RGB)");
selectWindow("AVG_Dic");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=1129 height=1045 position=Center");
selectWindow("MAX_Rot");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=1129 height=1045 position=Center");
selectWindow("MAX_GFP");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=1129 height=1045 position=Center");
selectWindow("Composite (RGB)");
run("Canvas Size...", "width=1129 height=1045 position=Center");
run("Combine...", "stack1=AVG_Dic stack2=MAX_Rot");
run("Combine...", "stack1=[Combined Stacks] stack2=MAX_GFP");
run("Combine...", "stack1=[Combined Stacks] stack2=[Composite (RGB)]");
```

Makro 2:

Mit dem zweiten Makro werden einzelne Bildausschnitte der drei aufgenommenen Bilder, nach dem Abzug des Hintergrunds, der z-Achsen Projektion und Kontrast Bearbeitung, ausgewählt. Hierfür wurde zuerst ein Bereich ausgewählt und daraufhin händisch von jedem Bild der Ausschnitt dupliziert (beim Absatz). Von den Ausschnitten erfolgt eine Zusammenlagerung der Fluoreszenzkanäle, Bild-Typ Änderung und Rahmen Anlagerung. Als letztes werden die Bilder kombiniert und als Tiff-Datei gespeichert.

```
selectWindow("MAX_GFP");
run("Specify ROI", " width=150 height=150 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("MAX_Rot");
run("Specify ROI", " width=150 height=150 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("AVG_Dic");
run("Specify ROI", " width=150 height=150 x=0 y=0 slice=1");
run("Synchronize Windows");

run("Merge Channels...", "c1=MAX_Rot-1 c2=MAX_GFP-1 create keep");
run("RGB Color", "frames");
selectWindow("Merged");
run("Canvas Size...", "width=155 height=155 position=Center");
selectWindow("AVG_Dic-1");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=155 height=155 position=Center");
selectWindow("MAX_Rot-1");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=155 height=155 position=Center");
selectWindow("MAX_GFP-1");
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=155 height=155 position=Center");
run("Combine...", "stack1=AVG_Dic-1 stack2=MAX_Rot-1");
run("Combine...", "stack1=[Combined Stacks] stack2=MAX_GFP-1");
run("Combine...", "stack1=[Combined Stacks] stack2=Merged");
saveAs("Tiff", "F:\\\\Daten PC 2019_Dez\\\\Projekt\\\\Ergebnisse\\\\Mikroskopie\\\\Bilder\\\\Combined Stacks.tif");
```

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aelst, L., Hohmann, S., Bulaya, B., Koning, W., Sierkstra, L., Neves, M. J., Luyten, K., Alijo, R., Ramos, J., Coccetti, P., Martegani, E., Magalhães-Rocha, N. M., Brandão, R. L., Dijck, P., Vanhalewyn, M., Durnez, P., & Thevelein, J. M. (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 8(5), 927–943.
- Ahuatzi, D., Herrero, P., De La Cera, T., & Moreno, F. (2004). The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14440–14446.
- Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., & Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4485–4493.
- Aitken, C. E., & Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural and Molecular Biology*, Vol. 19, Issue 6, pp. 568–576.
- Albrecht, G., Mösch, H. U., Hoffmann, B., Reusser, U., & Braus, G. H. (1998). Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 12696–12702.
- Aldea, M., Garí, E., & Colomina, N. (2007). Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle*, 6(21), 2599–2603.
- Alipourfard, I., Datukishvili, N., Bakhtiyari, S., Haghani, K., Di Renzo, L., de Miranda, R. C., & Mikeladze, D. (2019). MIG1 Glucose Repression in Metabolic Processes of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetics to Metabolic Engineering. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 11(3), 215–220.
- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F., & Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *Journal of Cell Biology*, 174(1), 89–100.
- Alone, P. V., & Dever, T. E. (2006). Direct binding of translation initiation factor eIF2γ-G domain to its GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors eIF5 and eIF2Bε. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12636–12644.
- Altting-Mees, M. A., & Short, J. M. (1989). Pbluescript II: Gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, Issue 22, p. 9494.
- Amodeo, A. A., & Skotheim, J. M. (2016). Cell-size control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4).
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106.
- Aranda, A., & del Olmo, M. (2003). Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20(8), 747–759.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J. D., Liu, C. L., Brown, P. O., & Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3889–3894.

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, Vol. 25, Issue 1, pp. 25–29.
- Ashe, M. P., De Long, S. K., & Sachs, A. B. (2000). Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 833–848.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2005). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Azoitei, N., Becher, A., Steinestel, K., Rouhi, A., Diepold, K., Genze, F., Simmet, T., & Seufferlein, T. (2016). PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation. *Molecular Cancer*, 15(1), 3.
- Balasubramanian, M. K., Bi, E., & Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Current Biology*, Vol. 14, Issue 18, pp. R806–R818.
- Barberis, M., De Gioia, L., Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., Vanoni, M., & Alberghina, L. (2005). The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27 Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochemical Journal*, 387(3), 639–647.
- Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast*, Vol. 20, Issue 6, pp. 509–543.
- Barrett, L., Orlova, M., Maziarz, M., & Kuchin, S. (2012). Protein kinase a contributes to the negative control of SNF1 protein kinase in *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 119–128.
- Barros, M. H., & McStay, G. P. (2020). Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes. *Mitochondrion*, Vol. 50, pp. 94–114.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 14, Issue 8, pp. 518–528.
- Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., & Lewis, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(4), 259–308.
- Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C., & Gancedo, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Letters*, 329(1–2), 51–54.
- Blom, J., De Mattos, M. J. T., & Grivell, L. A. (2000). Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4P. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1970–1973.
- Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 1–8.
- Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 8, Issue 2, pp. 149–160.
- Bojunga, N., & Entian, K. D. (1999). Cat8p, the activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1p). *Molecular and General Genetics*, 262(4–5), 869–875.

- Boles, E., & Hollenberg, C. P.** (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 21, Issue 1, pp. 85–111.
- Boles, E., Schulte, F., Miosga, T., Freidel, K., Schlüter, E., Zimmermann, F. K., Hollenberg, C. P., & Heinisch, J. J.** (1997). Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6- biphosphate. *Journal of Bacteriology*, 179(9), 2987–2993.
- Bolotin-Fukuhara, M.** (2017). Thirty years of the HAP2/3/4/5 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(5), 543–559.
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., & Jacquet, M.** (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1044–1052.
- Braman, J., Papworth, C., & Greener, A.** (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 57, pp. 31–44.
- Broach, J. R.** (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(1), 73–105.
- Brons, J. F., de Jong, M., Valens, M., Grivell, L. A., Bolotin-Fukuhara, M., & Blom, J.** (2002). Dissection of the promoter of the HAP4 gene in *S. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast*, 19(11), 923–932.
- Brown, T. A., Jarosch, B., & Seidler, L.** (2007). *Genome und Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik* (3. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Burwick, N., & Aktas, B. H.** (2017). The eIF2- α kinase HRI: a potential target beyond the red blood cell. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Vol. 21, Issue 12, pp. 1171–1177.
- Buschlen, S., Amillet, J. M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., & Bolotin-Fukuhara, M.** (2003). The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comparative and Functional Genomics*, 4(1), 37–46.
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M.** (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(6), 6195–6240.
- Byström, A. S., & Fink, G. R.** (1989). A functional analysis of the repeated methionine initiator tRNA genes (IMT) in yeast. *Mol Gen Genet*, 216, 276–286.
- Cabib, E.** (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 426, Issue 2, pp. 201–207.
- Cai, Y., & Wei, Y. H.** (2015). Distinct regulation of Maf1 for lifespan extension by Protein kinase A and Sch9. *Aging*, 7(2), 133–143.
- Cardozo, T., & Pagano, M.** (2004). The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 5, Issue 9, pp. 739–751.
- Carlson, M.** (1999). Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 202–207.

- Castelli, L. M., Lui, J., Campbell, S. G., Rowe, W., Zeef, L. A. H., Holmes, L. E. A., Hoyle, N. P., Bone, J., Selley, J. N., Sims, P. F. G., & Ashe, M. P. (2011). Glucose depletion inhibits translation initiation via eIF4A loss and subsequent 48S preinitiation complex accumulation, while the pentose phosphate pathway is coordinately up-regulated. *Molecular Biology of the Cell*, 22(18), 3379–3393.
- Castermans, D., Somers, I., Kriel, J., Louwet, W., Wera, S., Versele, M., Janssens, V., & Thevelein, J. M. (2012). Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Research*, 22(6), 1058–1077.
- Celenza, J. L., Marshall-Carlson, L., & Carlson, M. (1988). The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), 2130–2134.
- Cereghetti, G., Saad, S., Dechant, R., & Peter, M. (2018). Reversible, functional amyloids: towards an understanding of their regulation in yeast and humans. *Cell Cycle*, 17(13), 1545–1558.
- Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P., & Morales, J. (2017). Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Research*, 45(3), e15.
- Cherkasova, V., Qiu, H., & Hinnebusch, A. G. (2010). Snf1 Promotes Phosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 by Activating Gcn2 and Inhibiting Phosphatases Glc7 and Sit4. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), 2862–2873.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L., & Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230–233.
- Clarke, D. J., & Bachant, J. (2008). Kinetochore structure and spindle assembly checkpoint signaling in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioscience*, 13(17), 6787–6819.
- Cocchetti, P., Nicastro, R., & Tripodi, F. (2018). Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 5(11), 482–494.
- Cohen, R., Yokoi, T., Holland, J. P., Pepper, A. E., & Holland, M. J. (1987). Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene ENO1 is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 7(8), 2753–2761.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., De Winde, J. H., Gorwa, M. F., Colavizza, D., & Thevelein, J. M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 17(12), 3326–3341.
- Cortassa, S., Aon, J. C., & Aon, M. A. (1995). Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(2), 193–208.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23(3), 536–545.
- Dalal, C. K., Cai, L., Lin, Y., Rahbar, K., & Elowitz, M. B. (2014). Pulsatile dynamics in the yeast proteome. *Current Biology*, 24(18), 2189–2194.
- Das, S., Ghosh, R., & Maitra, U. (2001). Eukaryotic Translation Initiation Factor 5 Functions as a GTPase-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6720–6726.

- Davidson, G. S., Joe, R. M., Roy, S., Meirelles, O., Allen, C. P., Wilson, M. R., Tapia, P. H., Manzanilla, E. E., Dodson, A. E., Chakraborty, S., Carter, M., Young, S., Edwards, B., Sklar, L., & Werner-Washburne, M. (2011). The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 22(7), 988–998.
- de Alteriis, E., Carteni, F., Parascandola, P., Serpa, J., & Mazzoleni, S. (2018). Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle*, Vol. 17, Issue 6, pp. 688–701.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), 149–156.
- De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., & Brocard, C. (2005). A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *The EMBO Journal*, 24(23), 4115–4123.
- Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Mark Lathrop, G., & Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- α kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nature Genetics*, 25(4), 406–409.
- Delgado, L. M., O'Connor, J.E., Azori, I., Renau-Piqueras, J., Gil, L. M., & Gozalbo, D. (2001). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, Vol. 147.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., & Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338), 680–686.
- Dever, T. E., Kinzy, T. G., & Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(1), 65–107.
- Devit, M. J., Waddle, J. A., & Johnston, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Molecular Biology of the Cell*, 8(8), 1603–1618.
- DeWaal, D., Nogueira, V., Terry, A. R., Patra, K. C., Jeon, S. M., Guzman, G., Au, J., Long, C. P., Antoniewicz, M. R., & Hay, N. (2018). Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. *Nature Communications*, 9(1).
- Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., & Rigoulet, M. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate: A possible role in crabtree effect induction? *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26948–26955.
- Díaz-Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., & Rigoulet, M. (2009). Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, Vol. 1796, Issue 2, pp. 252–265.
- Dong, Y., Hu, J., Fan, L., & Chen, Q. (2017). RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16.
- Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3493–3511.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127–6145.

- Egner, A., Jakobs, S., & Hell, S. W.** (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3370–3375.
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R. M., Albers, E., Snoep, J. L., Boles, E., Hohmann, S., & Gustafsson, L.** (2004). Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5323–5330.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R.** (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*, 61(3), 263–274.
- Enserink, J. M., & Kolodner, R. D.** (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division*, Vol. 5, Issue 1, p. 11.
- Entian, K. D., & Frohlich, K. U.** (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *Journal of Bacteriology*, 158(1), 29–35.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., & Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3610–3616.
- Feldman, R. M. R., Correll, C. C., Kaplan, K. B., & Deshaies, R. J.** (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, 91(2), 221–230.
- Fendt, S.M., & Sauer, U.** (2010). Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates. *BMC Syst Biol* 4, 12.
- Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., Dai, W., & Guo, C.** (2020). Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, Vol. 39, Issue 1, pp. 1–19.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A., & Wigler, M.** (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 2159–2165.
- Fishbein, R., Benkovic, P. A., & Benkovic, S. J.** (1975). The Anomeric Specificity of Yeast Pyruvate Kinase toward Activation by D-Fructose 1,6-Bisphosphatete. *Biochemistry*, 14(18), 4060–4063.
- François, J., & Parrou, J. L.** (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 125–145.
- Fu, L., Bounelis, P., Dey, N., Browne, B. L., Marchase, R. B., & Bedwell, D. M.** (1995). The posttranslational modification of phosphoglucomutase is regulated by galactose induction and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3087–3094.
- Futcher, B.** (2006). Metabolic cycle, cell cycle, and the finishing kick to start. *Genome Biology*, 7(4), 107.
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A.** (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, Vol. 14, Issue 6, pp. 629–638.
- Gancedo, J. M.** (1998). Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334–361.

- Gancedo, J. M.** (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, Issue 4, pp. 673–704.
- García, R., Bravo, E., Diez-Muñiz, S., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J.** (2017). A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Scientific Reports*, 7(1), 5703.
- Garre, E., Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V., & Matallana, E.** (2009). Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 9(1), 52–62.
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J.** (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, Issue 11, pp. 891–899.
- Gebauer, F., & Hentze, M. W.** (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 5, Issue 10, pp. 827–835.
- Gibney, P. A., Schieler, A., Chen, J. C., Rabinowitz, J. D., & Botstein, D.** (2015). Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), 6116–6121.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., & Fink, G. R.** (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6), 1077–1090.
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G.** (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546–567.
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H.** (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541–1553.
- Gordiyenko, Y., Llácer, J. L., & Ramakrishnan, V.** (2019). Structural basis for the inhibition of translation through eIF2 α phosphorylation. *Nature Communications*, 10(1).
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., & Schüller, C.** (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes and Development*, 12(4), 586–597.
- Grauslund, M., & Rønnow, B.** (2000). Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(12), 1096–1100.
- Gray, M., Piccirillo, S., Purnapatre, K., Schneider, B. L., & Honigberg, S. M.** (2008). Glucose induction pathway regulates meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* in part by controlling turnover of Ime2p meiotic kinase. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 676–684.
- Grundmann, O., Mösch, H. U., & Braus, G. H.** (2001). Repression of GCN4 mRNA Translation by Nitrogen Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25661–25671.

- Guaragnella, N., Ždravlević, M., Lattanzio, P., Marzulli, D., Pracheil, T., Liu, Z., Passarella, S., Marra, E., & Giannattasio, S. (2013). Yeast growth in raffinose results in resistance to acetic-acid induced programmed cell death mostly due to the activation of the mitochondrial retrograde pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2765–2774.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D., & Hegemann, J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 23.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., & Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 183(4120), 46–51.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., & Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66(2), 352–359.
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246(4930), 629–634.
- He, S., Bystricky, K., Leon, S., François, J. M., & Parrou, J. L. (2009). The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. *FEBS Journal*, 276(19), 5432–5446.
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2009). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience*, 13, 2408–2420.
- Heinisch, J. J., Boles, E., & Timpel, C. (1996). A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-bisphosphate: Glycolysis/metabolic regulation/allosteric control. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 15928–15933.
- Hernandez-Alias, X., Benisty, H., Schaefer, M. H., & Serrano, L. (2020). Translational efficiency across healthy and tumor tissues is proliferation-related. *Molecular Systems Biology*, 16(3).
- Herrero, P., Martínez-Campa, C., & Moreno, F. (1998). The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 434(1–2), 71–76.
- Hers, H. G. (1984). The discovery and the biological role of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 12, Issue 5, pp. 729–735.
- Heyer, E. E., & Moore, M. J. (2016). Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell*, 164(4), 757–769.
- Hinnebusch, A. G. (2011). Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 434–467.
- Hinnebusch, A. G. (1985). A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(9), 2349–2360.
- Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 407–450.
- Hinnebusch, A. G. (2017). Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 42, Issue 8, pp. 589–611.

- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N.** (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1413–1416.
- Höckner, S.** (2016). Aktivatoren der Ubiquitin-Ligase APC/C: Mechanismen und Regulation im Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae*. *Dissertation*, Universität Regensburg
- Hohmann, S., Neves, M. J., de Koning, W., Alijo, R., Ramos, J., & Thevelein, J. M.** (1993). The growth and signalling defects of the *ggs1* (*fdp1/byp1*) deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Current Genetics*, 23(4), 281–289.
- Holcik, M., & Sonenberg, N.** (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 318–327.
- Holland, M. J., & Holland, J. P.** (1978). Isolation and Identification of Yeast Messenger Ribonucleic Acids Coding for Enolase, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, and Phosphoglycerate Kinase. *Biochemistry*, 17(23), 4900–4907.
- Holmes, L. E. A., Campbell, S. G., De Long, S. K., Sachs, A. B., & Ashe, M. P.** (2004). Loss of Translational Control in Yeast Compromised for the Major mRNA Decay Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 2998–3010.
- Huberts, D. H. E. W., Niebel, B., & Heinemann, M.** (2012). A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. *FEMS Yeast Research*, 12(2), 118–128.
- Huxley, C., Green, E. D., & Dunham, I.** (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in Genetics*, 6(C), 236.
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghani, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S.** (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 218–223.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., & Knop, M.** (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962.
- Jaspersen, S. L., Huneycutt, B. J., Giddings, T. H., Resing, K. A., Ahn, N. G., & Winey, M.** (2004). Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Developmental Cell*, 7(2), 263–274.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., & Pavletich, N. P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376(6538), 313–320.
- Jiang, Y.** (2006). Regulation of the Cell Cycle by Protein Phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 440–449.

- Jin, M., Fuller, G. G., Han, T., Yao, Y., Alessi, A. F., Freeberg, M. A., Roach, N. P., Moresco, J. J., Karnovsky, A., Baba, M., Yates, J. R., Gitler, A. D., Inoki, K., Klionsky, D. J., & Kim, J. K. (2017). Glycolytic Enzymes Coalesce in G Bodies under Hypoxic Stress. *Cell Reports*, 20(4), 895–908.
- Jorgensen, P., & Tyers, M. (2004). How Cells Coordinate Growth and Division. *Current Biology*, 14(23), R1014–R1027.
- Jules, M., Beltran, G., François, J., & Parrou, J. L. (2008). New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 605–614.
- Jurica, M. S., Mesecar, A., Heath, P. J., Shi, W., Nowak, T., & Stoddard, B. L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*, 6(2), 195–210.
- Käppeli, O. (1986). Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, 28(C), 181–209.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J., & Wigler, M. (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell*, 37(2), 437–445.
- Kato, M. (2005). An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: Assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 69, Issue 4, pp. 663–672.
- Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*, Vol. 1, Issue 6, pp. 395–403.
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6).
- Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., & Johnson, A. D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, 68(4), 709–719.
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A., & Klionsky, D. J. (1996). Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: Potential commercial applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1563–1569.
- Kim, J. H., Roy, A., Jouandot, D., & Cho, K. H. (2013). The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, Vol. 1830, Issue 11, pp. 5204–5210.
- Klein, C. J. L., Rasmussen, J. J., Rønnow, B., Olsson, L., & Nielsen, J. (1999). Investigation of the impact of MIG1 and MIG2 on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 68(2–3), 197–212.
- Köivomägi, M., & Loog, M. (2011). Cdk1: A kinase with changing substrate specificity. *Cell Cycle*, Vol. 10, Issue 21, pp. 3625–3626.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, Vol. 299, Issues 1–2, pp. 1–34.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, Vol. 361, Issues 1–2, pp. 13–37.
- Kretschmer, M., & Fraenkel, D. G. (1991). Yeast 6-Phosphofructo-2-kinase: Sequence and Mutant. *Biochemistry*, 30(44), 10663–10672.

- Kruckeberg, A. L.** (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, Vol. 166, Issue 5, pp. 283–292.
- Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L., & Blom, J.** (2003). Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biology*, 4(1), R3.
- Lee, C. D., & Tu, B. P.** (2017). Metabolic influences on RNA biology and translation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 52, Issue 2, pp. 176–184.
- Lee, J. H., Moir, R. D., & Willis, I. M.** (2009). Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12604–12608.
- Lee, P., Cho, B.R., Joo, H.S., & Hahn, J.S.** (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular Microbiology*, 70(4), 882–895.
- Lee, P., Kim, M. S., Paik, S. M., Choi, S. H., Cho, B. R., & Hahn, J. S.** (2013). Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 587(22), 3648–3655.
- Lew, D. J., & Reed, S. I.** (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: Regulation by Cdc28 and cyclins. *Journal of Cell Biology*, 120(6), 1305–1320.
- Lillie, S. H., & Pringle, J. R.** (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*, 143(3), 1384–1394.
- Lin, Y., Sohn, C. H., Dalal, C. K., Cai, L., & Elowitz, M. B.** (2015). Combinatorial gene regulation by modulation of relative pulse timing. *Nature*, 527(7576), 54–58.
- Lin, Z., & Li, W. H.** (2012). Evolution of 5' untranslated region length and gene expression reprogramming in yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1), 81–89.
- Litsios, A., Huberts, D. H. E. W., Terpstra, H. M., Guerra, P., Schmidt, A., Buczak, K., Papagiannakis, A., Rovetta, M., Hekelaar, J., Hubmann, G., Exterkate, M., Milias-Argeitis, A., & Heinemann, M.** (2019). Differential scaling between G1 protein production and cell size dynamics promotes commitment to the cell division cycle in budding yeast. *Nature Cell Biology*, 21(11), 1382–1392.
- Liu, Z., & Butow, R. A.** (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics*, Vol. 40, pp. 159–185.
- Longtine, M. S., McKenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R.** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953–961.
- Luengo, A., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G.** (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chemical Biology*, Vol. 24, Issue 9, pp. 1161–1180.
- Lundin, M., Nehlin, J. O., & Ronne, H.** (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1979–1985.
- Mai, B., & Breeden, L.** (1997). Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Molecular and Cellular Biology*, 17(11), 6491–6501.
- Malumbres, M.** (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.

- Mao, Y., & Chen, C.** (2019). The Hap Complex in Yeasts: Structure, Assembly Mode, and Gene Regulation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1645.
- Martinez-Ortiz, C., Carrillo-Garmendia, A., Correa-Romero, B. F., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., Olivares-Marin, I. K., & Madrigal-Perez, L. A.** (2019). SNF1 controls the glycolytic flux and mitochondrial respiration. *Yeast*, 36(8), 487–494.
- McAlister, L., & Holland, M. J.** (1985). Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry*, 260(28), 15019–15027.
- McCammon, M. T., Epstein, C. B., Przybyla-Zawislak, B., McAlister-Henn, L., & Butow, R. A.** (2003). Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), 958–972.
- McCartney, R. R., & Schmidt, M. C.** (2001). Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36460–36466.
- McNabb, D. S., Xing, Y., & Guarente, L.** (1995). Cloning of yeast HAP5: A novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes and Development*, 9(1), 47–58.
- Meijer, H. A., & Thomas, A. A. M.** (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5h-untranslated region of an mRNA. *Biochem. J.*, Vol. 367.
- Mendenhall, M. D., & Hodge, A. E.** (1998). Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1191–1243.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., & Thomas, P. D.** (2019). PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D419–D426.
- Miles, S., Li, L., Davison, J., & Breeden, L. L.** (2013). Xbp1 Directs Global Repression of Budding Yeast Transcription during the Transition to Quiescence and Is Important for the Longevity and Reversibility of the Quiescent State. *PLoS Genetics*, 9(10), e1003854.
- Mitchison, T. J., & Salmon, E. D.** (2001). Mitosis: A history of division. *Nature Cell Biology*, Vol. 3, Issue 1, pp. E17–E21.
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., & Hirata, D.** (2013). Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the whi3 cell cycle regulator in budding yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10558–10566.
- Moir, R. D., Lee, J. H., Haeusler, R. A., Desai, N., Engelke, D. R., & Willis, I. M.** (2006). Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15044–15049.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., & Nasmyth, K.** (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW15. *Cell*, 66(4), 743–758.

- Moreno, F., Ahuatz, D., Riera, A., Palomino, C. A., & Herrero, P.** (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 265–268.
- Morgan, D. O.** (2007). The Cell Cycle Principles of Control. *New Science Press*.
- Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., Peikert, C. D., Dannenmaier, S., Drepper, F., Weill, U., Höß, P., Feuerstein, R., Gebert, M., Bohnert, M., van der Laan, M., Schuldiner, M., Schütze, C., Oeljeklaus, S., Pfanner, N., Wiedemann, N., & Warscheid, B.** (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports*, 19(13), 2836–2852.
- Morrisette, V. A., & Rolfes, R. J.** (2020). The intersection between stress responses and inositol pyrophosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, Vol. 66, Issue 5, pp. 901–910.
- Mueller, P. P., & Hinnebusch, A. G.** (1986). Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*. *Cell*, 45(2), 201–207.
- Mülhardt, C.** (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics (6 Auflage). *Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag*.
- Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., RahaD., Gerstein M., & Snyder, M.** (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science*, 320, 1344–1349.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M., & Ronne, H.** (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: A transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO Journal*, 10(11), 3373–3377.
- Neiman, A. M.** (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 565–584.
- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaite, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A.** (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, 176(5), 1083–1097.e18.
- Newcomb, L. L., Diderich, J. A., Slatery, M. G., & Heideman, W.** (2003). Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryotic Cell*, 2(1), 143–149.
- Nissler, K., Otto, A., Schellenberger, W., & Hofmann, E.** (1983). Similarity of activation of yeast phosphofructokinase by AMP and fructose-2,6-bisphosphate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111(1), 294–300.
- Nwaka, S., Kopp, M., & Holzer, H.** (1995). Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 10193–10198.
- Nwaka, S., & Holzer, H.** (1997). Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 58, Issue C, pp. 197–237.
- Ohno, K., & Kimura, G.** (1984). Genetic analysis of control of proliferation in fibroblastic cells in culture. II. Alteration in proliferative and survival phenotypes in a set of temperature-sensitive mutants of rat 3Y1 cells after infection or transformation with simian virus 40. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 10(1), 29–36.

- Okuda, A., & Kimura, G.** (1996). An Amino Acid Change in Novel Protein D123 Is Responsible for Temperature-Sensitive G1-Phase Arrest in a Mutant of Rat Fibroblast Line 3Y1. *Experimental Cell Research*, 223(2), 242–249.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R. M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., & Gustafsson, L.** (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Reports*, 5(5), 532–537.
- Özcan, S., & Johnston, M.** (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1564–1572.
- Özcan, S., Dover, J., & Johnston, M.** (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 17(9), 2566–2573.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölfl, S., & Johnston, M.** (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12428–12432.
- Özcan, S., & Johnston, M.** (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 554–569.
- Ozsolak, F., & Milos, P. M.** (2011). RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 12, Issue 2, pp. 87–98.
- Panvert, M., Dubiez, E., Arnold, L., Perez, J., Mechulam, Y., Seufert, W., & Schmitt, E.** (2015). Cdc123, a Cell Cycle Regulator Needed for eIF2 Assembly, Is an ATP-Grasp Protein with Unique Features. *Structure*, 23(9), 1596–1608.
- Pavitt, G. D.** (2005). eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochemical Society Transactions*, 33(6), 1487–1492.
- Pavitt, G. D., Ramaiah, K. V. A., Kimball, S. R., & Hinnebusch, A. G.** (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2b subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes and Development*, 12(4), 514–526.
- Peeters, K., Van Leemputte, F., Fischer, B., Bonini, B. M., Quezada, H., Tsytlonok, M., Haesen, D., Vanthienen, W., Bernardes, N., Gonzalez-Blas, C. B., Janssens, V., Tompa, P., Versées, W., & Thevelein, J. M.** (2017). Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nature Communications*, 8(1), 922.
- Peláez, R., Fernández-García, P., Herrero, P., & Moreno, F.** (2012). Nuclear import of the yeast hexokinase 2 protein requires α/β -importin-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3518–3529.
- Perzmaier, A. F.** (2011). Die Rolle des Zellproliferationsproteins Cdc123 bei der Initiation der Translation. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Perzmaier, A. F., Richter, F., & Seufert, W.** (2013). Translation initiation requires cell division cycle 123 (Cdc123) to facilitate biogenesis of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2). *The Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 21537–21546.
- Pfeiffer, T., & Morley, A.** (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1(OCT), 17.
- Polymenis, M., & Aramayo, R.** (2015). Translate to divide: control of the cell cycle by protein synthesis. *Microbial Cell*, 2(4), 94–104.

- Portela, P., Howell, S., Moreno, S., & Rossi, S.** (2002). In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30477–30487.
- Portela, P., Moreno, S., & Rossi, S.** (2006). Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein. *Biochemical Journal*, 396(1), 117–126.
- Pospíšek, M., & Valášek, L.** (2013). Polysome profile analysis - Yeast. *Methods in Enzymology*, Vol. 530, pp. 173–181.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., & Van Dijken, J. P.** (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 12, Issue 16, pp. 1607–1633.
- Proud, C. G.** (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(1), 3–12.
- Radonjic, M., Andrau, J.C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T. T. J. P., van Leenen, D., van Berkum, N. L., & Holstege, F. C. P.** (2005). Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon *S. cerevisiae* Stationary Phase Exit. *Molecular Cell*, 18(2), 171–183.
- Randez-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J. A., & Moreno, F.** (1998). Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 425(3), 475–478.
- Rehm, H., & Letzel, T.** (2010). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics (6 Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Reifenberger, E., Boles, E., & Ciriacy, M.** (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 324–333.
- Reimand, J., Vaquerizas, J. M., Todd, A. E., Vilo, J., & Luscombe, N. M.** (2010). Comprehensive reanalysis of transcription factor knockout expression data in *Saccharomyces cerevisiae* reveals many new targets. *Nucleic Acids Research*, 38(14), 4768–4777.
- Reineke, A.** (2004). Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendungene (Auflage 1). Stuttgart: UTB.
- Richardson, H., Lew, D. J., Henze, M., Sugimoto, K., & Reed, S. I.** (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes and Development*, 6(11), 2021–2034.
- Rodnina, M. V.** (2016). The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Science*, 25(8), 1390–1406.
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., & Moreno, F.** (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 355(3), 625–631.
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M.** (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183–201.
- Rossi, R. L., Zinzalla, V., Mastriani, A., Vanoni, M., & Alberghina, L.** (2005). Subcellular localization of the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is modulated by the carbon source in budding yeast. *Cell Cycle*, 4(12), 1798–1807.

- Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Shirra, M. K., Arndt, K. M., & Schmidt, M. C. (2008). Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 222–230.
- Rubio-Cabezas, O., Patch, A. M., Minton, J. A. L., Flanagan, S. E., Edghill, E. L., Hussain, K., Balafrej, A., Deeb, A., Buchanan, C. R., Jefferson, I. G., Mutair, A., Hattersley, A. T., & Ellard, S. (2009). Wolcott-Rallison syndrome is the most common genetic cause of permanent neonatal diabetes in consanguineous families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(11), 4162–4170.
- Saad, S., Cereghetti, G., Feng, Y., Picotti, P., Peter, M., & Dechant, R. (2017). Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress. *Nature Cell Biology*, 19(10), 1202–1213.
- Sakihama, Y., Hidese, R., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2019). Increased flux in acetyl-CoA synthetic pathway and TCA cycle of *Kluyveromyces marxianus* under respiratory conditions. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- Santangelo, G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 70(1), 253–282.
- Sanz, P. (2003). Snf1 protein kinase: A key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), 178–181.
- Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. J., & Carlson, M. (2000). Regulatory Interactions between the Reg1-Glc7 Protein Phosphatase and the Snf1 Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1321–1328.
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., & Wigler, M. (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9303–9307.
- Sato-Tadano, A., Suzuki, T., Amari, M., Takagi, K., Miki, Y., Tamaki, K., Watanabe, M., Ishida, T., Sasano, H., & Ohuchi, N. (2013). Hexokinase II in breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 α and Ki-67. *Cancer Science*, 104(10), 1380–1388.
- Scheper, G. C., Van Der Knaap, M. S., & Proud, C. G. (2007). Translation matters: Protein synthesis defects in inherited disease. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 8, Issue 9, pp. 711–723.
- Schepers, W., Van Zeebroeck, G., Pinkse, M., Verhaert, P., & Thevelein, J. M. (2012). In vivo phosphorylation of Ser21 and Ser83 during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44130–44142.
- Schlegel, H. G. (2006). Allgemeine Mikrobiologie (8 Auflage.). *Thieme Verlag*.
- Schmidt, G. W., Welkenhuysen, N., Ye, T., Cvijovic, M., & Hohmann, S. (2020). Mig1 localization exhibits biphasic behavior which is controlled by both metabolic and regulatory roles of the sugar kinases. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(6), 1489–1500.
- Schmitt, E., Blanquet, S., & Mechulam, Y. (2002). The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors. *EMBO Journal*, 21(7), 1821–1832.
- Schmitt, E., Naveau, M., & Mechulam, Y. (2010). Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: A heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Letters*, Vol. 584, Issue 2, pp. 405–412.
- Schüller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, Vol. 43, Issue 3, pp. 139–160.

- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), 233–244.
- Seino, A., Yanagida, Y., Aizawa, M., & Kobatake, E. (2005). Translational control by internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1681(2–3), 166–174.
- Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., & Plotkin, J. B. (2013). XRate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell*, 153(7), 1589.
- Shashkova, S., Wollman, A. J. M., Leake, M. C., & Hohmann, S. (2017). The yeast Mig1 transcriptional repressor is dephosphorylated by glucose-dependent and -independent mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 364, Issue 14, p. 133).
- Sheff, M. A., & Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(8), 661–670.
- Singer, M. A., & Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell*, 1(5), 639–648.
- Sivakumar, S., & Gorbisky, G. J. (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 16, Issue 2, pp. 82–94.
- Smallbone, K., Malys, N., Messiha, H. L., Wishart, J. A., & Simeonidis, E. (2011). Building a kinetic model of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, Vol. 500, pp. 355–370.
- Smith, F. C., Davies, S. P., Wilson, W. A., Carling, D., & Hardie, D. G. (1999). The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Letters*, 453(1–2), 219–223.
- Snitkin, E. S., Dudley, A. M., Janse, D. M., Church, G. M., & Segrè, D. (2008). Model-driven analysis of experimentally determined growth phenotypes for 465 yeast gene deletion mutants under 16 different conditions. *Genome Biology*, 9(9), R140.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, Vol. 136, Issue 4, pp. 731–745.
- Soontorngun, N. (2017). Reprogramming of nonfermentative metabolism by stress-responsive transcription factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, Vol. 63, Issue 1, pp. 1–7.
- Sprague, G. F., & Cronan, J. E. (1977). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *Journal of Bacteriology*, 129(3), 1335–1342.
- Stickland, L. H. (1956). The Pasteur effect in normal yeast and its inhibition by various agents. *The Biochemical Journal*, 64(3), 503–515.
- Teixeira, L. K., & Reed, S. I. (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 387–414.
- Thevelein, J. M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 48(1).
- Thevelein, J. M., & De Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, Vol. 33, Issue 5, pp. 904–918.
- Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Sciences*, 20(1), 3–10.

- Thompson, G. M., Pacheco, E., Melo, E. O., & Castilho, B. A.** (2000). Conserved sequences in the β subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2 γ . *Biochem. J.*, Vol. 347.
- Tijane, M. N., Seydoux, F. J., Hill, M., Roucous, C., & Laurent, M.** (1979). Octameric structure of yeast phosphofructokinase as determined by crosslinking with disuccinimidyl β -hydromuconate. *FEBS Letters*, 105(2), 249–253.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G., & Wigler, M.** (1987). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(4), 1371–1377.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., & Wigler, M.** (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, 40(1), 27–36.
- Treitel, M. A., & Carlson, M.** (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3132–3136.
- Treitel, M. A., Kuchin, S., & Carlson, M.** (1998). Snf1 Protein Kinase Regulates Phosphorylation of the Mig1 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6273–6280.
- Trendeleva, T. A., & Zvyagilskaya, R. A.** (2018). Retrograde Signaling as a Mechanism of Yeast Adaptation to Unfavorable Factors. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 83, Issue 2, pp. 98–106.
- Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V., & Coccetti, P.** (2015). Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, Vol. 1850, Issue 4, pp. 620–627.
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N.** (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, 10(1), 2–13.
- Tzamarias, D., & Struhl, K.** (1994). Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, 369(6483), 758–761.
- Van Ende, M., Wijnants, S., & Van Dijck, P.** (2019). Sugar sensing and signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, Issue JAN, p. 99.
- Van Niekerk, G., & Engelbrecht, A. M.** (2018). Role of PKM2 in directing the metabolic fate of glucose in cancer: a potential therapeutic target. *Cellular Oncology*, Vol. 41, Issue 4, pp. 343–351.
- Varghese, E., Samuel, S. M., Líšková, A., Samec, M., Kubatka, P., & Büsselberg, D.** (2020). Targeting glucose metabolism to overcome resistance to anticancer chemotherapy in breast cancer. *Cancers*, Vol. 12, Issue 8, pp. 1–34.
- Veisova, D., Macakova, E., Rezabkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., & Obsilova, V.** (2012). Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochemical Journal*, 443(3), 663–670.
- Versele, M., De Winde, J. H., & Thevelein, J. M.** (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO Journal*, 18(20), 5577–5591.

- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A.** (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1299–1304.
- Vicente, R. L., Spina, L., Gómez, J. P. L., Dejean, S., Parrou, J. L., & François, J. M.** (2018). Trehalose-6-phosphate promotes fermentation and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 5(10), 444–459.
- Vidgren, V., Kankainen, M., Londesborough, J., & Ruohonen, L.** (2011). Identification of regulatory elements in the AGT1 promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast*, 28(8), 579–594.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., & Carlson, M.** (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes and Development*, 15(9), 1104–1114.
- Vodermaier, H. C.** (2004). APC/C and SCF: Controlling each other and the cell cycle. *Current Biology*, Vol. 14, Issue 18, pp. R787–R796.
- Von Der Haar, T.** (2012). Mathematical and computational modelling of ribosomal movement and protein synthesis: An overview. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Vol. 1, Issue 1, p. e201204002.
- Vowinckel, J., Hartl, J., Butler, R., & Ralser, M.** (2015). MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion*, 24, 77–86.
- Wang, H., Nicolay, B. N., Chick, J. M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., Gao, H., Yang, G., Williams, J. A., Suski, J. M., Keibler, M. A., Sicinska, E., Gerdemann, U., Haining, W. N., Roberts, T. M., Polyak, K., Gygi, S. P., Dyson, N. J., & Sicinski, P.** (2017). The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*, 546(7658), 426–430.
- Wang, Y., Lo, W. C., & Chou, C. S.** (2017). A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. *PLoS Computational Biology*, 13(11), e1005843.
- Warburg, O.** (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
- Wei, D., & Sun, Y.** (2010). Small RING finger proteins RBX1 and RBX2 of SCF E3 ubiquitin ligases: The role in cancer and as cancer targets. *Genes and Cancer*, 1(7), 700–707.
- Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., & Schade, A. L.** (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 267–272.
- Weinzierl, S.** (2011). Genetische Studien zur Kopplung von Proteinsynthese und Zellteilung in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., & Singer, R. A.** (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, Vol. 57, Issue 2, pp. 383–401.
- Westermann, B., & Neupert, W.** (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15), 1421–1427.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E.** (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464(3), 123–128.

- Wills, C.** (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), 245–280.
- Wu, W., & Zhao, S.** (2013). Metabolic changes in cancer: Beyond the Warburg effect. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol. 45, Issue 1, pp. 18–26.
- Wurzenberger, C., & Gerlich, D. W.** (2011). Phosphatases: Providing safe passage through mitotic exit. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 12, Issue 8, pp. 469–482.
- Xu, Y. F., Zhao, X., Glass, D. S., Absalan, F., Perlman, D. H., Broach, J. R., & Rabinowitz, J. D.** (2012). Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allostery Independent of Phosphorylation. *Molecular Cell*, 48(1), 52–62.
- Xue, Y., Batlle, M., & Hirsch, J. P.** (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G(α) subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO Journal*, 17(7), 1996–2007.
- Young, S. K., & Wek, R. C.** (2016). Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(33), 16927–16935.
- Zahringer, H., Thevelein, J. M., & Nwaka, S.** (2000). Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Molecular Microbiology*, 35(2), 397–406.
- Zeyl, C.** (2000). Budding yeast as a model organism for population genetics. *Yeast*, Vol. 16, Issue 8, pp. 773–784.
- Zhan, K., Narasimhan, J., & Wek, R. C.** (2004). Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 168(4), 1867–1875.
- Zhang, Y., McCartney, R. R., Chandrashekarappa, D. G., Mangat, S., & Schmidt, M. C.** (2011). Reg1 protein regulates phosphorylation of all three Snf1 isoforms but preferentially associates with the Gal83 isoform. *Eukaryotic Cell*, 10(12), 1628–1636.
- Zhou, Y., Zhu, Y., Dai, L., Men, Y., Wu, J., Zhang, J., & Sun, Y.** (2017). Efficiency Analysis and Mechanism Insight of that Whole-Cell Biocatalytic Production of Melibiose from Raffinose with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 407–423.

9 VERZEICHNISSE

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Nomenklatur, Einheiten und Basen & Aminosäuren

In der Arbeit vorkommenden Gene und Proteine wurde nach der Hefenomenklatur aufgeführt. Englische Fachausdrücke von denen es keine deutschen Übersetzungen gibt, wurden für die Arbeit übernommen.

In dieser Arbeit wurden folgende gebräuchliche Einheiten verwendet:

Ω	Ohm	k	Kilo (10^3)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	c	centi (10^{-2})
A	Ampere	m	Milli (10^{-3})
F	Farad	μ	Mikro (10^{-6})
g	Gramm	n	Nano (10^{-9})
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung		
h	Stunden		
l	Liter		
M	molar (mol/l)		
m	Meter		
min	Minuten		
sec	Sekunden		
U	Unit		
V	Volt		

Basen & Aminosäuren

A	Adenin	T	Thymin
C	Cytosin	U	Uracil
G	Guanin		
Ala/A	Alanin	Leu/L	Leucin
Arg/R	Arginin	Lys/K	Lysin
Asn/N	Asparagin	Met/M	Methionin
Asp/D	Asparaginsäure	Phe/F	Phenylalanin
Cys/C	Cystein	Pro/P	Prolin
Gln/Q	Glutamin	Ser/S	Serin
Glu/E	Glutaminsäure	Thr/T	Threonin
Gly/G	Glycin	Trp/T	Tryptophan
His/H	Histidin	Tyr/y	Tyrosin
Ile/I	Isoleucin	Val/V	Valin

Abkürzungen

++	Medium mit allen Aminosäuren
1C	einfacher DNA-Gehalt
2C	doppelter DNA-Gehalt
Δ	Deletion

A

A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC/C	„ <i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i> “
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

B

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin

C

Cak	CDK-aktivierende Kinasen („ <i>CDK activating kinase</i> “)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre („ <i>complementary</i> “) DNA
CDC	Zellzyklus Gene („ <i>cell division cycle</i> “)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase („ <i>cyclin dependent kinase</i> “)
CDS	codierende Region („ <i>coding sequence</i> “)
Ch	Chaperone
Chx	Cycloheximid
Cki	Cyclinabhängige-Kinase-Inhibitoren („ <i>cyclin-dependent kinase inhibitors</i> “)
ClonNAT	Nourseothricin
CoA	Coenzym A
CSRE	Kohlenstoffquellen reagierendes Element („ <i>carbon source-responsive element</i> “)
C _T	Zyklus Schwellenwert („ <i>cycle threshold</i> “)
CTD	carboxyterminale Domäne
C-terminal	carboxyterminal
Cyt	Cytochrom

D

D	Glukose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast („ <i>contrast</i> “)
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (latein: „ <i>et altera</i> “)
EtBr	Ethidumbromid
EtOH	Ethanol

F

F	Fraktion
FEAR	„ <i>Cdc fourteen early anaphase release</i> “
FSC	Vorwärtstreulicht „ <i>forward scatter</i> “

G

G	Gap
G418	Kanamycin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein („ <i>GTPase activating protein</i> “)
GCN	„ <i>General control non-derepressible</i> “
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor („ <i>guanine nucleotide exchange factor</i> “)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycerin
GO	Genontologie
GoI	Gen von Interesse („ <i>gene of interest</i> “)
GTP	Guanosintriphosphat

H

HA	Hämagglutinin-Epitop
HIR	heme-regulated inhibitor

I

IK	Initiationskomplex
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle („ <i>internal ribosome entry site</i> “)

K

KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat
kb	Kilobase

L

LB	Luria Broth, Bakterienmedium
LCR	„ <i>low complexity regions</i> “
LiAc	Lithiumacetat

M

M	Mitose
MEN	„ <i>mitotic exit network</i> “
MBF	MCB Binding Faktor
MFK	Multifaktorkomplex
mRNA	„ <i>messenger</i> “ RNA
mRNP	„ <i>messenger</i> “ Ribonukleoprotein

N

n	Stichprobenanzahl
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NLS	Nuklear Lokalisationssequenz
ns	nicht signifikant
N-terminal	Aminoterminal

O

OD _x	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)

P

P	Phosphat
PABP	PolyA-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasenketten Reaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PEG	Polyethylen Glykol
PERK	„ <i>PKR-like ER kinase</i> “
PFK	Phosphofruktokinase
PIK	Präinitiationskomplex
PKA	Protein-Kinase A
PKM2	Pyruvatkinase M2
PKR	„ <i>Protein kinase double-stranded RNA-dependend</i> “
Pol III	Polymerase III
PP1	Proteinphosphatase 1
qPCR	Quantitative PCR

R

R	Raffinose
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Hochdurchsatz-mRNA-Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („ <i>reactive oxygen species</i> “)
Rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raumtemperatur

S

S	Synthese
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAC	Spindelkontrollsystem („ <i>spindle assembly checkpoint</i> “)
SBF	SCB Binding-Faktor
SCF	Skip1, Cullin und F-Box-Protein
SD	Synthetisches Medium mit Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat („ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “)
SPK	Spindelpol Körper
STRE	„ <i>stress response element</i> “

T

TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris/EDTA
TCA	Tricarbonsäure Zyklus („ <i>tricarboxylic acid</i> “)
TE	Translationseffizienz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	„ <i>translocase of the inner membrane</i> “
TK	ternärer Komplex
TOM	„ <i>translocase of the outer membrane</i> “
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
tRNA _i ^{Met}	Initiator-Methionin-tRNA

U

uORF	„ <i>upstream</i> “ ORF
UPS	Das Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolettes Licht

W

WRS	Wolcott-Rallison-Syndrom
WT	Wildtyp

X

XY	Hefe-Vollmedium
----	-----------------

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Wachstumsphasen der Bäckerhefe.	1
Abbildung 3-2: Ablauf der Glykolyse.	4
Abbildung 3-3: Trehalose Speicher in <i>S. cerevisiae</i>	6
Abbildung 3-4: Erkennung und Verstoffwechselung von Glukose in <i>S. cerevisiae</i>	10
Abbildung 3-5: Lebenszyklus der Bäckerhefe.	16
Abbildung 3-6: Zellteilungszyklus in <i>S. cerevisiae</i>	17
Abbildung 3-7: Transkriptionskontrolle während dem G1/S-Übergang.	20
Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der Translationsinitiation in Eukaryoten.	23
Abbildung 3-9: Modell der eIF2-Assemblierung durch Cdc123.	27
Abbildung 3-10: eIF2 Aktivierung für die Translationsinitiation.	28
Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der <i>GCN4</i> -Translation.	30
Abbildung 3-12: Modell der Snf1-Regulation von eIF2 α -Phosphorylierung.	31
Abbildung 4-1: eIF2 defiziente Mutanten.	34
Abbildung 4-2: <i>GCN4</i> -Analysen in eIF2-Mutanten.	36
Abbildung 4-3: Wachstum und Zellzyklus ist in eIF2-Mutanten verändert.	38
Abbildung 4-4: Mehr Sic1 positive Zellen in eIF2-Mutanten.	40
Abbildung 4-5: Veränderte Zellgröße in eIF2-Mutanten.	42
Abbildung 4-6: Analyse der Kohlstoffquelle in Wildtyp und <i>cdc123-Δ326</i>	45
Abbildung 4-7: Einfluss von Glycerin auf Zellzyklus Eintritt und Morphologie.	47
Abbildung 4-8: Polysomen-Profile der eIF2-Mutanten.	50
Abbildung 4-9: Untersuchung von <i>GCN4</i> in den Polysomen-Fraktionen.	52
Abbildung 4-10: Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten.	55
Abbildung 4-11: Translationseffizienz in Bezug auf die Länge der codierenden Region.	58
Abbildung 4-12: Vergleich der Polysomen-Fraktionen F3 und F6.	60
Abbildung 4-13: Gene-Ontology-Analyse.	63
Abbildung 4-14: Veränderte Expression der Gene, die für mitochondriale Proteine codieren	65
Abbildung 4-15: Mitochondrienmorphologie in <i>cdc123-Δ326</i>	67
Abbildung 4-16: Analyse von Hap4 in <i>cdc123-Δ326</i>	69
Abbildung 4-17: Erhöhte Expression von Glukose-reprimierten Gene in eIF2-Mutanten.	72
Abbildung 4-18: Analyse von Mig1 in eIF2-Mutanten.	74
Abbildung 4-19: Zellzyklus und Wachstum nach Deletion von <i>MIG1</i>	75
Abbildung 4-20: Analyse der Mig1 Regulation durch Snf1 in <i>cdc123-Δ326</i>	77
Abbildung 4-21: Veränderte Reg1-Menge in <i>cdc123-Δ326</i>	79

Abbildung 4-22: <i>REG1</i> vermittelter Wachstumseffekt.	81
Abbildung 4-23: Analyse von <i>pTEF2-REG1</i> in <i>cdc123-Δ326</i>	83
Abbildung 4-24: Die für Enzyme der Glykolyse-codierenden Gene sind in eIF2-Mutanten runterreguliert.	87
Abbildung 4-25: Hxk2 in eIF2-Mutanten.	88
Abbildung 4-26: Wachstum auf XYD von <i>cdc123-Δ326 tps1Δ</i>	91
Abbildung 4-27: Phosphofruktokinase in <i>cdc123-Δ326</i>	94
Abbildung 4-28: Dauerhaft aktives Ras führt zu weniger 1C-Zellen in <i>cdc123-Δ326</i>	96
Abbildung 4-29: Überexpression von <i>PDE2</i> verändert Zellzyklus-Verteilung.	98
Abbildung 4-30: PKA-Aktivitätsbestimmung durch Cki1.	100
Abbildung 4-31: Untersuchung der Gene, die am stärksten in Hefe exprimiert werden.	103
Abbildung 4-32: Einfluss von Gcn4 auf Cdc19-GFP-Kondensate.	105
Abbildung 4-33: Cdc19-GFP-Kondensate und Glukose-Repression.	106
Abbildung 4-34: Cdc19-GFP-Kondensate und PKA.	107
Abbildung 4-35: Cdc19-GFP-Kondensate in Mutanten des Glukose-Stoffwechselwegs.	108
Abbildung 4-36: Cdc19-GFP-Kondensat in Abhängigkeit der Kohlenstoffquellen.	110
Abbildung 4-37: Atmungsdefizienz führt zur Bildung von Cdc19-GFP-Kondensat.	114
Abbildung 5-1: Model der veränderten Glukose-gesteuerte Prozesse in eIF2-Mutanten.	117
Abbildung 6-1: Integration der Plasmid-DNA am Selektionsmarker.	135
Abbildung 6-2: Markierung eines endogenen Gens.	136
Abbildung 6-3: Fluoreszenzkurven der qPCR.	150
Abbildung 6-4: Generierung der Polysomen-Profile.	160
Abbildung 10-1: Analyse <i>GCN4</i> & <i>XBP1</i> in Glukose und Glycerin.	218
Abbildung 10-2: Hautkomponenten-Analyse der RNA-Sequenzierungsexperimente.	219
Abbildung 10-3: Transkriptom-Analyse im W303.	220
Abbildung 10-4: Translatom-Analyse im W303.	220
Abbildung 10-5: <i>HAP4</i> -Analysen.	221
Abbildung 10-6: Untersuchung von Snf1.	222
Abbildung 10-7: Untersuchung von Maf1, ein PKA Target.	223
Abbildung 10-8: Cdc19-Proteinmengen und Co-Lokalisation.	224

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 6-1: Laserintensitäten und Belichtungszeiten der „ <i>Spinning-disc</i> “-Mikroskopie.	139
Tabelle 6-2: Pipettierschema und Ablauf der reversen Transkription.	144
Tabelle 6-3: KOD-PCR-Ansatz.	146
Tabelle 6-4: PCR-Ansatz gezielte Mutagenese.	148
Tabelle 6-5: Kolonie-PCR-Ansatz.	148
Tabelle 6-6: Primer Mastermix für die qPCR.	151
Tabelle 6-7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gel.	157
Tabelle 7-1: Medien für die Anzucht von Bakterien- und Hefestämme.	162
Tabelle 7-2: Puffer und Lösungen.	163
Tabelle 7-3: Verwendete Nukleinsäuren.	166
Tabelle 7-4: Verwendete Enzyme und die Hersteller.	166
Tabelle 7-5: Verwendete Kits und die Hersteller.	166
Tabelle 7-6: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.	167
Tabelle 7-7: Verwendete und hergestellte Hefestämme.	168
Tabelle 7-8: Verwendete und hergestellte Plasmide.	179
Tabelle 7-9: Oligonukleotide mit Verwendungszweck.	180
Tabelle 7-10: Verwendete Software und Datenbanken.	187

9.4 Formelverzeichnis

Formel 6-1: Berechnung des Zellvolumen (Vol).	140
Formel 6-2: Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität.	141
Formel 6-3: Berechnung der Primer Effizienz (E).	150
Formel 6-4: Quantitative Bestimmungen der Genexpressionen.	151

10 ANHANG

10.1 Daten auf der beigefügten CD

- Doktorarbeit im PDF-Format
- DeSeq-Daten der Experimente (S288c, S288c *gcn4* Δ , W303): Counts, normalisiert und log2 Veränderungen. Die Signifikanz ist ebenfalls aufgeführt.
- Zusammenfassung der drei Experimente in einer Tabelle (Tabelle Zusammenfassung): Name und Länge der Gene, log2 Veränderungen und Signifikanz. Drei Reiter: Transkripte, Polysomal und Polysomal vs. Gesamt.
- Tabelle der annotierten Gcn4-Zielgene laut SGD (Gcn4-Targets, vgl. Abbildung 4-10).
- Tabelle, die für GO-Analysen herangezogen wurde (GO-Analysen), Ergebnisse der PANTHER Internetseite für die hochregulierten Gene (vgl. Abbildung 4-13).
- Tabelle, die für die Analyse der mitochondrialen Proteine herangezogen wurde nach Morgenstern et al., 2017 (mitochondriale Proteine, vgl. Abbildung 4-14).
- Tabelle, die für die Analyse der Glukose reprimierten Gene herangezogen wurde nach Radonjic et al., 2005 (vgl. Abbildung 4-17).

10.2 Zusätzliche Abbildungen

Abbildungen wurden in den Ergebnissteilen erwähnt und erklärt, für eine genaue Beschreibung im Ergebnis nachlesen.

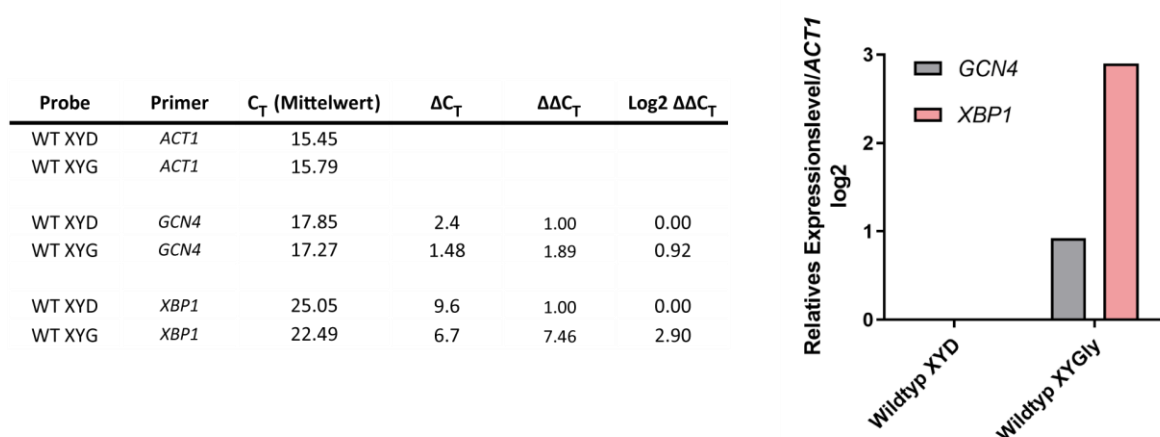


Abbildung 10-1: Analyse *GCN4* & *XBP1* in Glukose und Glycerin. Für die Isolation der mRNA wurde der über Nacht in XYD und XYGly bei 25°C exponentiell wachsende Wildtypstamm (K699) geerntet und mit der Phenol-Chloroform-Methode isoliert. Für die cDNA-Synthese wurde 50 ng RNA eingesetzt. Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Rotor-Gene Q (Qiagen), wobei „SYBR Green“ als DNA interkalierender Farbstoff eingesetzt wurde. Als Referenz-Gen wurde Aktin (*ACT1*) herangezogen. Die *GCN4*- und *XBP1*-Menge wurde auf *ACT1* normalisiert. Die Werte wurden auf den Wildtyp bezogen. Links sind die Rohdaten abgebildet und rechts sind die log2 Werte dargestellt.

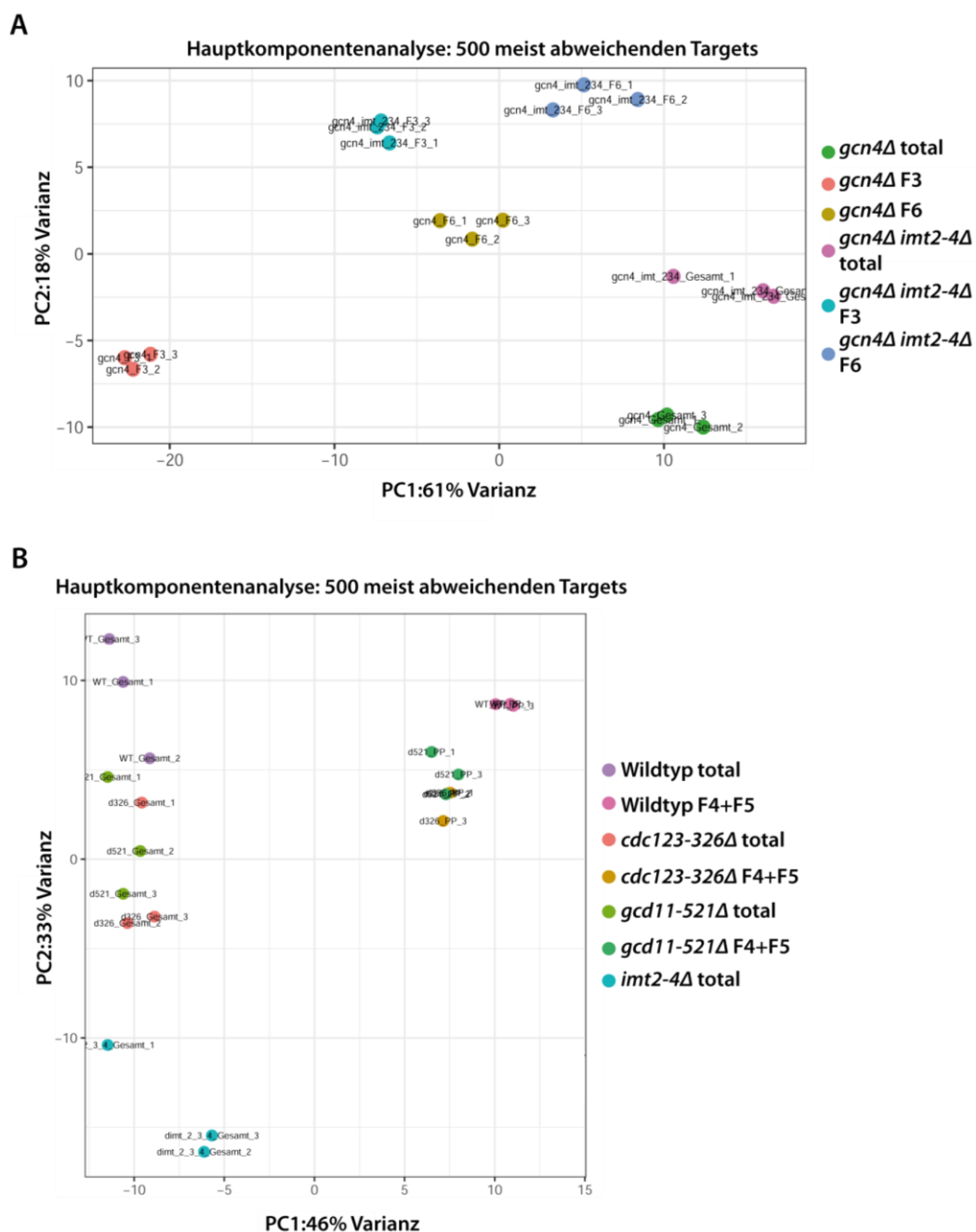


Abbildung 10-2: Hauptkomponenten-Analyse der RNA-Sequenzierungsexperimente. Aufgetragen sind die Gesamt- sowie Polysomen-assoziierte mRNA. Hauptkomponenten-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten. Dargestellt sind die 500 am stärksten veränderten mRNAs der unterschiedlichen Genotypen, sowohl polysomale- als auch Gesamt-mRNA. Von allen Bedingungen wurden Triplikate analysiert. **A**, W9057 (*gcn4Δ*) und W15486 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ gcn4Δ*). Stämme in **B**, K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W15566 (*gcd11-Δ521*) und W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*).

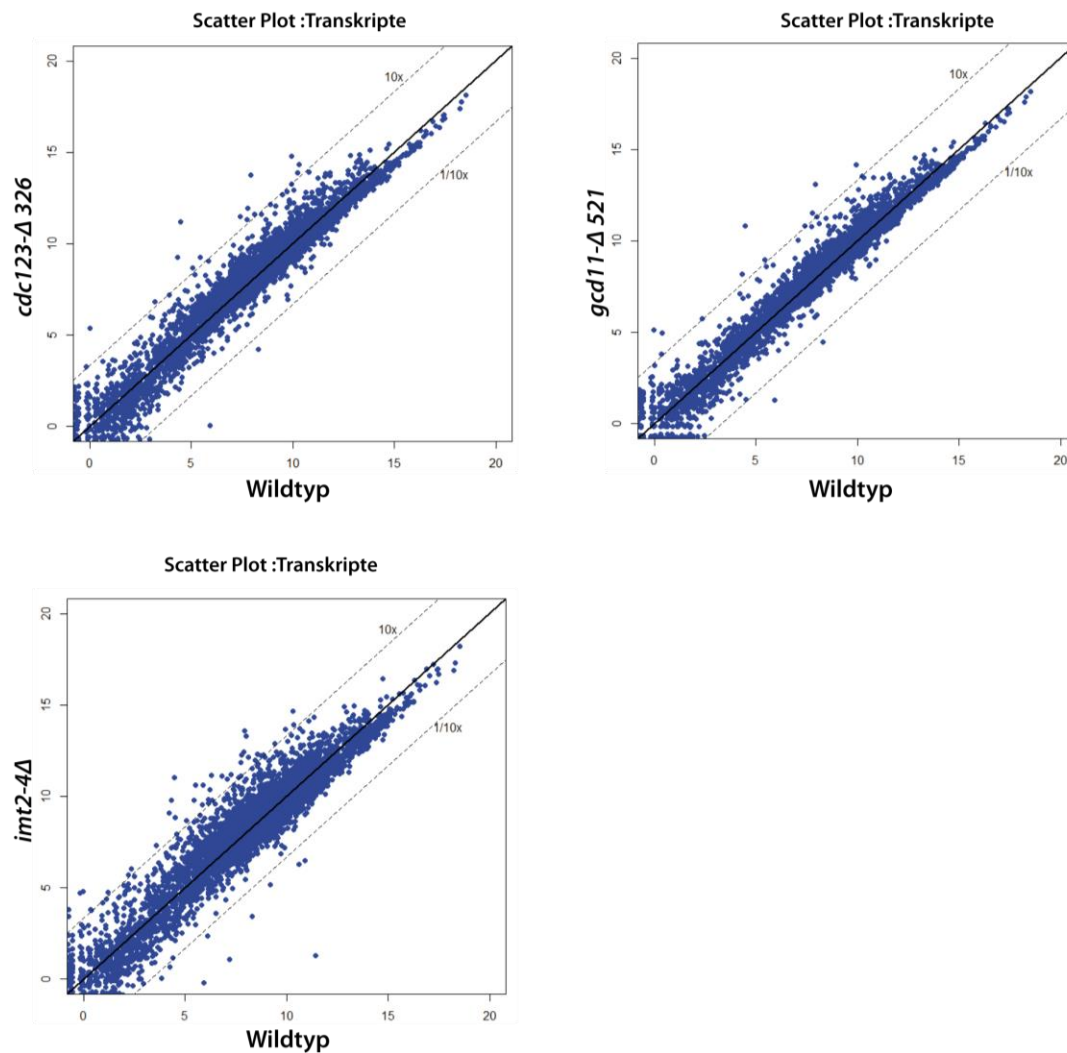


Abbildung 10-3: Transkriptom-Analyse im W303. Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*), W15566 (*gcd11-Δ521*) und W15766 (*imt2Δ imt3Δ imt4Δ*). Im Scatterplot werden die „Reads“ der Mutante gegen Wildtyp aufgetragen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht eine 10-fache Veränderung der Genexpression, wobei die Gene oberhalb stärker und unterhalb der Mittellinie schwächer in der Mutante exprimiert werden.

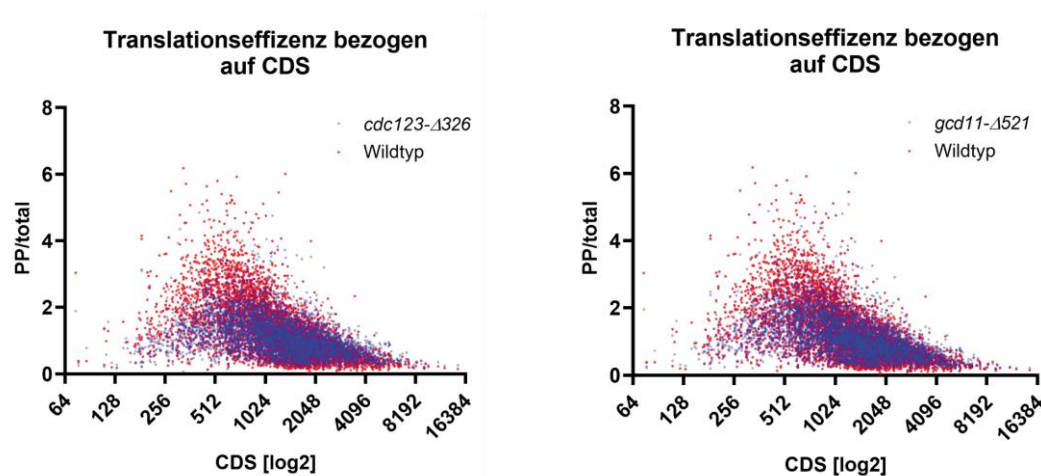


Abbildung 10-4: Translatom-Analyse im W303. Stämme K699 (Wildtyp), W15596 (*cdc123-Δ326*) und W15566 (*gcd11-Δ521*). Hier wurden die „Reads“ der polysomalen durch die Gesamt-RNA geteilt, der Quotient daraufhin gegen die codierende Region (CDS) in log2 aufgetragen. Wildtyp (rot) und Mutante (blau) wurden übereinandergelegt.

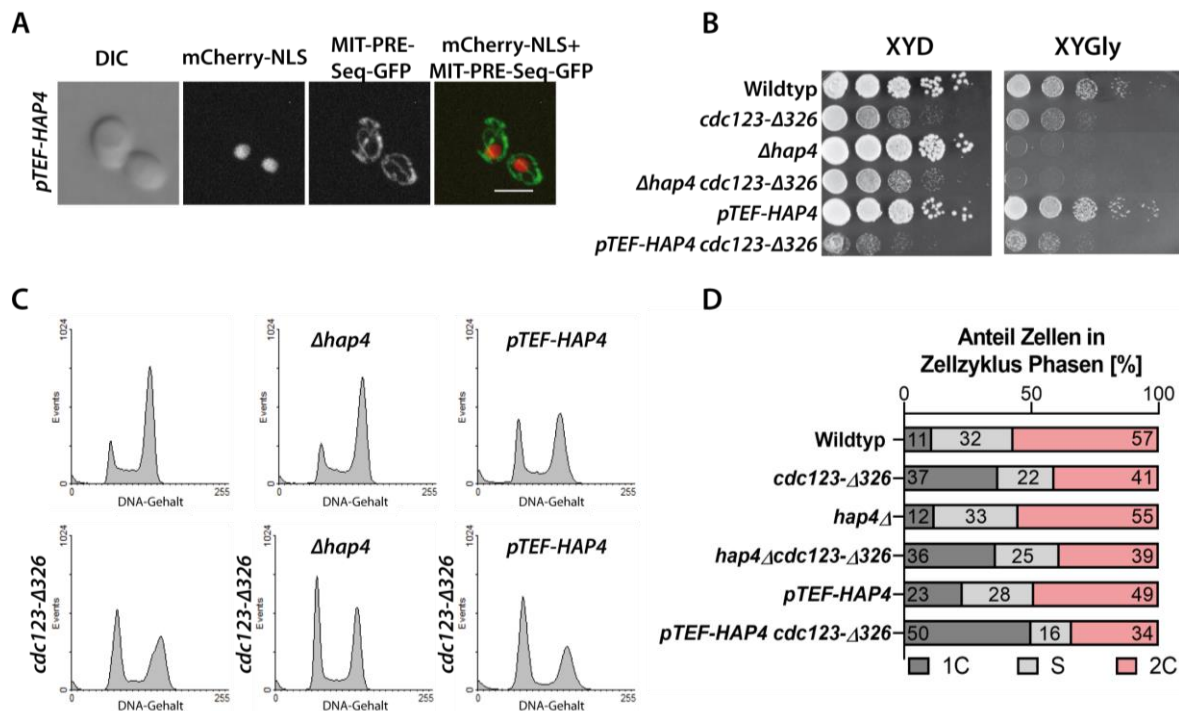


Abbildung 10-5: HAP4-Analysen. **A**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurde der Stamm W18084 (*pTEF2-HAP4 mCherry-NLS pTEF2-PRE-Seq-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 µm, zwischen den Ebenen, verwendet. **B**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp) W15596 (*cdc123-Δ326-HA3*) W17367 (*hap4Δ*) W17369 (*hap4Δ cdc123-Δ326-HA3*) W17392 (*pTEF2-FLAG3-HAP4*) W17392 (*pTEF2-FLAG3-HAP4 cdc123-Δ326-HA3*) über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48 h bei 25°C inkubiert. **B**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus A über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und die exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **B**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

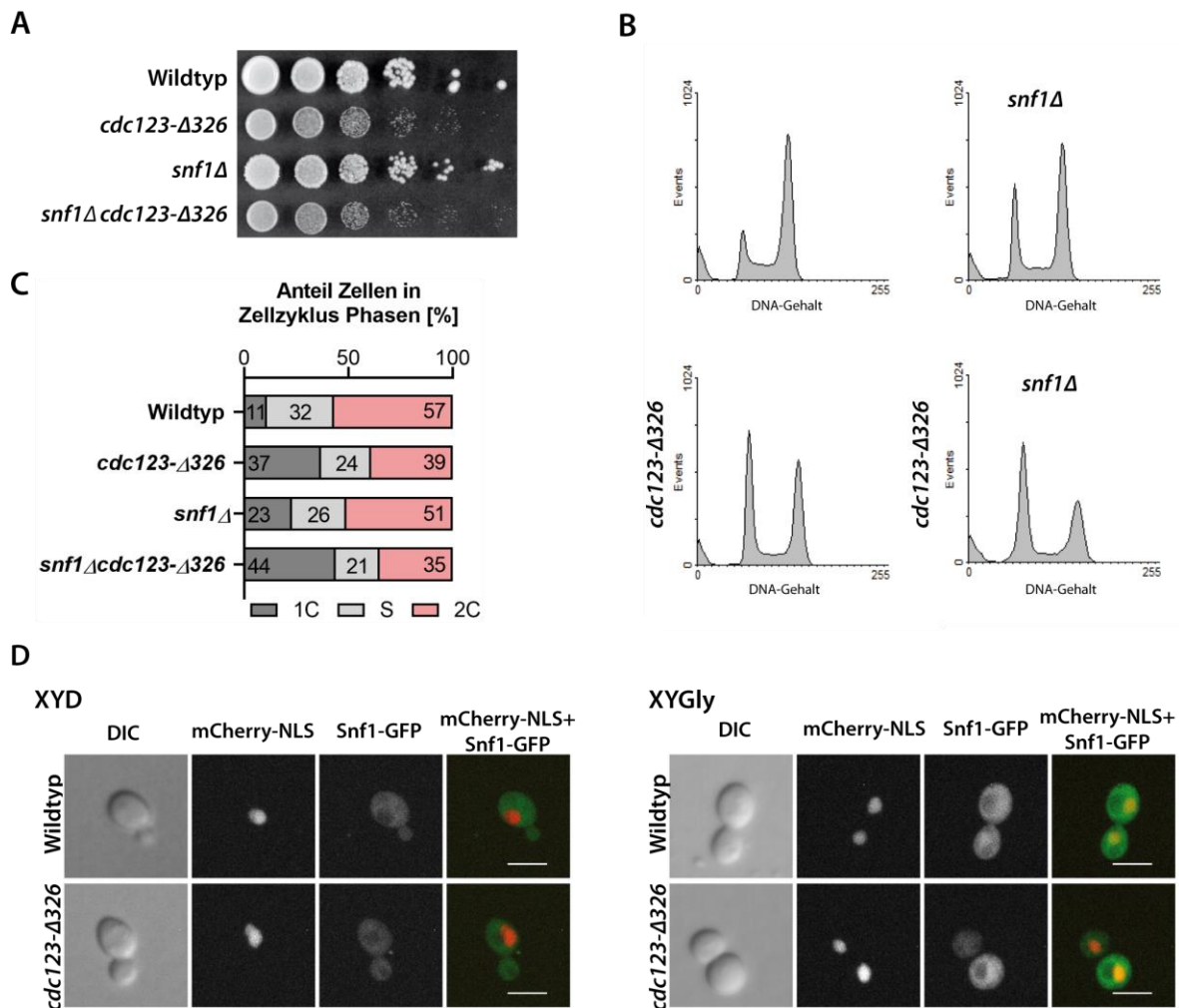


Abbildung 10-6: Untersuchung von Snf1. **A**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp) W15596 (*cdc123-Δ326*) W16769 (*snf1Δ*) W16774 (*cdc123-Δ326 snf1Δ*) über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **B**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus A über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Sytox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **C**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase). **D**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W16740 (*mCherry-NLS SNF1-GFP*) und W16742 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS SNF1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD und XYGly angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ bzw. SGly ++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

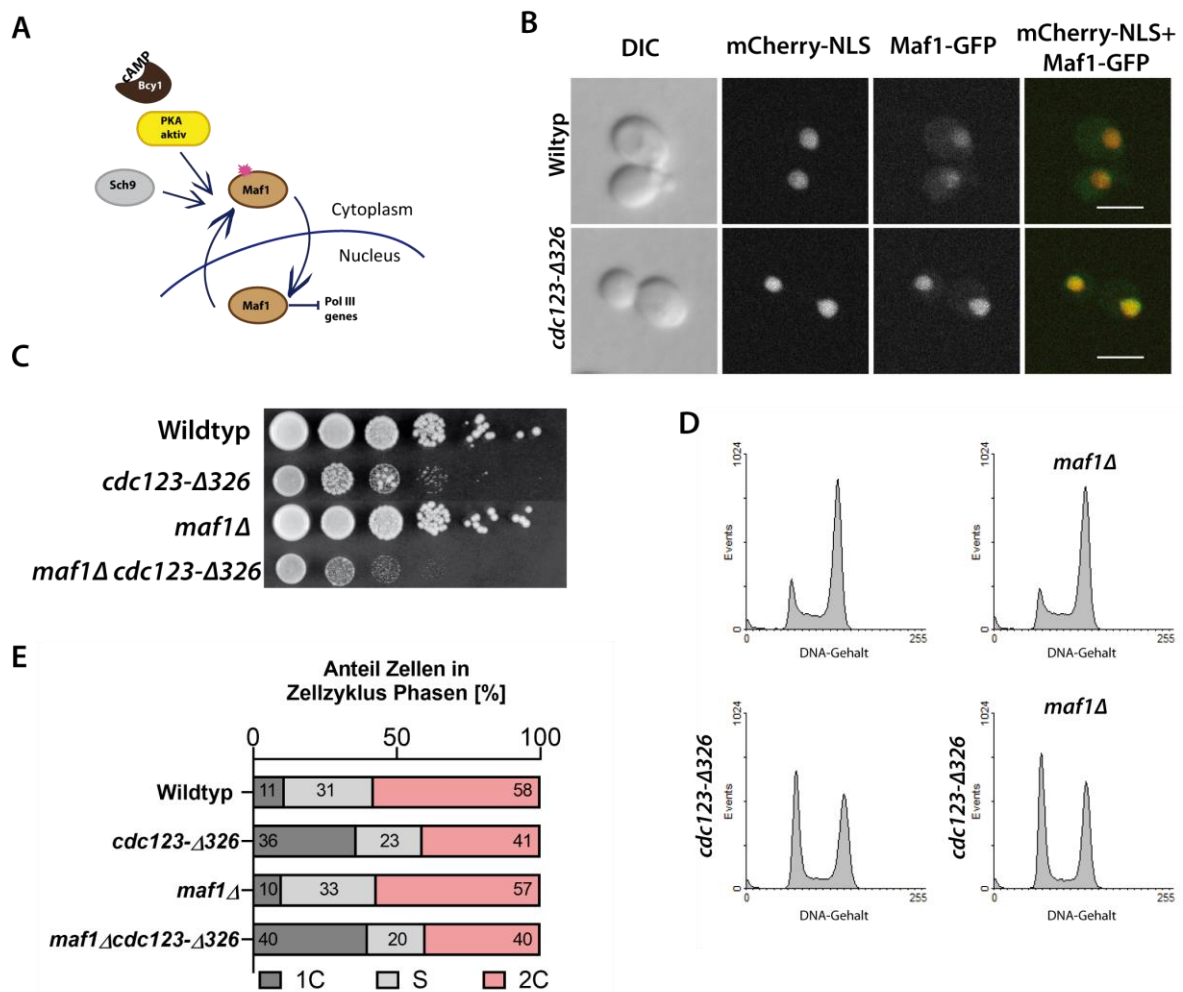


Abbildung 10-7: Untersuchung von Maf1, ein PKA Target. **A**, Schematische Darstellung der Regulation von Maf1. Maf1 wird durch die aktive PKA und Sch9 phosphoryliert. Dadurch bleibt es im Cytoplasma lokalisiert. Unter Stress Bedingung und wird es dephosphoryliert, in den Nukleus importiert und inhibiert die Expression von Polymerase 3 (Pol III) Gene **B**, Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17362 (*mCherry-NLS MAF1-GFP*), W17364 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS MAF1-GFP*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurde 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **C**, Für den Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp) W15596 (*cdc123-Δ326*) W17858 (*maf1Δ*) W17859 (*cdc123-Δ326 maf1Δ*) über Nacht bei 30°C bis zur Stationarität angezogen. Ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei die niedrigste Konzentration 10⁻⁵ war (von links nach rechts). Die Zellen wurden daraufhin auf eine XYD-Platte überführt und 48h bei 25°C inkubiert. **D**, Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Stämme aus C über Nacht bei 25°C in XYD kultiviert und exponentiell wachsende Zellen geerntet, mit Ethanol (EtOH 70%) fixiert und mit „Syttox Green“ inkubiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer CyFlow Space. **E**, Dargestellt sind die dazugehörigen prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes, die mithilfe der Flow Max Express 4 Software ermittelt wurden. (einfach 1C, doppelt 2C und S-Phase).

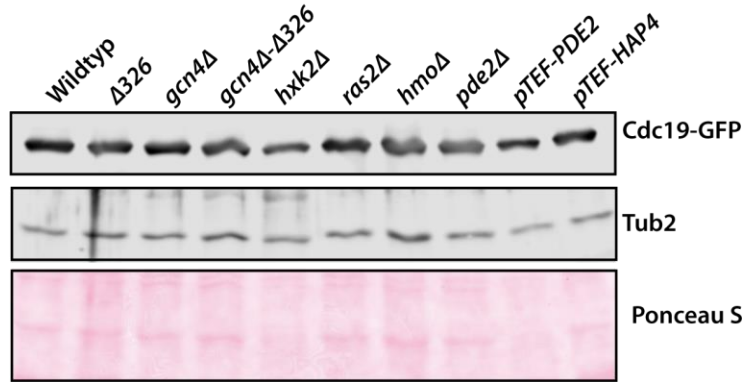
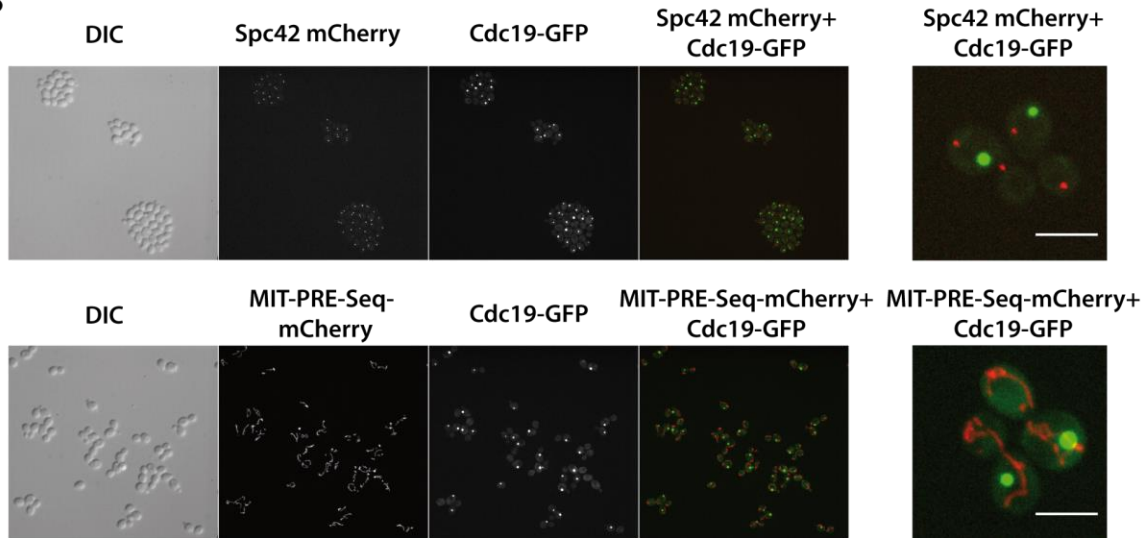
A**B**

Abbildung 10-8: Cdc19-Proteinmengen und Co-Lokalisation. A, Für die Analyse der Proteinmenge wurden aus folgenden exponentiell, über Nacht in XYD bei 25°C, wachsenden Zellen Proteinlysate hergestellt: W17182 (*mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17174 (*cdc123-Δ326 mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17682 (*gcn4Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17683 (*cdc123-Δ326 gcn4Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17675 (*hxx2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17673 (*ras2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17640 (*hmo1Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17671 (*pde2Δ mCherry-NLS CDC19-GFP*), W17680 (*PTEF2-PDE2 mCherry-NLS CDC19-GFP*) und W17678 (*PTEF2-HAP4 mCherry-NLS CDC19-GFP*). Für die Western-Analyse wurden 1 OD₅₉₅ Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte für Gcn4 mit einem FLAG-spezifischen Antikörper, α-FLAG M2, als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen, hier erfolgte die Detektion mit einem spezifischen Antiserum α-Tubulin2 (Tub2). Außerdem ist die PonceauS-Färbung für die Gesamt-Proteom Darstellung abgebildet. **B,** Für die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen wurden die Stämme W17730 (*CDC19-GFP SPC42-mCherry*) und W17677 (*CDC19-GFP pTPI1-PRE-Seq.-mCherry*) über Nacht bei 25°C in XYD angezogen und die exponentiell wachsenden Zellen anschließend auf einem Deckgläschen unter SD++ Agar für die Mikroskopie präpariert. Für die Aufnahmen wurden 16 Z-Stapel in einem Abstand von 0,6 μm, zwischen den Ebenen, verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

11 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 03.09.1987
 Geburtsort: Seligenstadt
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Anschrift: Guerickestraße 12, 93053 Regensburg

Akademischer Werdegang und Schulbildung:

Seit 11/2016 Universität Regensburg
 Promotion am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie
 Dissertationsthema: „Eine eIF2 verursachte Störung der Translationsinitiation verändert Glukose-gesteuerte Prozesse in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“
 Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

07/2015 – 06/2016 Universität Marburg
 Doktorand Institut für Molekulare Onkologie

10/2012 – 02/2015 Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
 Biochemie und Molekularbiologie, Master of Science (1,5)

10/2008 – 09/2012 Technische Hochschule Bingen
 Biotechnologie, Bachelor of Science (2,2)

08/2007-07/2008 ELT London Sprachschule, England

09/2004 – 06/2007 Claus-von-Stauffenberg-Schule Gymnasiale Oberstufen
 Allgemeine Hochschulreife

Publikationen

Doose G., Haake A., Bernhart SH., López C., Duggimpudi S., **Wojciech F.**, Bergmann AK., Borkhardt A. et al., (2015). MINCR is a MYC-induced lncRNA able to modulate MYC's transcriptional network in Burkitt lymphoma cells. PNAS 112

12 DANKSAGUNG

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit
mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe

Ein Versuch ist es jedoch Wert!

So eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Ich möchte mich deshalb bei den Menschen, die an meiner Seite waren und mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben, von ganzem Herzen bedanken!

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater, Chef und Wegweiser Wolfgang Seufert. Du hast mir die Chance geben, meine Arbeit in dem Lehrstuhl zu machen! Außerdem hast du mir die Freiheit und das Vertrauen geschenkt, meinen Weg zu gehen und mich zu entfalten. Es hat wirklich viel Spaß gemacht und ich habe sehr viel gelernt!

Auch an meine zwei Mentoren und Gutachter Christian Koch und Jan Medenbach geht ein herzlicher Dank. In den Jahresberichten habt ihr euch neben den inhaltlichen Aspekten auch für mein persönliches Wohlergehen in der Arbeitsgruppe interessiert. Natürlich auch ein großer Dank für das Begutachten der Arbeit.

Liebe Arbeitsgruppe, ihr wart immer da, wenn ich euch gebraucht hab, inhaltlich als auch persönlich. Wenn was nicht so gelaufen ist, habt ihr mich aufgebaut und mir Mut zugesprochen! Ein besonderer Dank geht an Simone! Nicht nur, dass wir zusammen an einem ähnlichen Thema arbeiten und uns sehr gut fachlich und persönlich austauschen konnten, du hast mich zudem sehr unterstützt. Außerdem hast du dir die Zeit genommen, die Arbeit zu lesen und zu korrigieren, vielen Dank. Liebe Adelheid, wenn es ein technisches Problem gab, warst du immer die erste Ansprechpartnerin. Zudem hast du dich am Ende meiner Arbeit so sehr ins Zeug gelegt, um mir zu helfen. Das schätze ich sehr, vielen Dank dafür. Liebe Arletti, zu dir konnte ich immer kommen, lachen, weinen und reden, danke, dass du für mich da warst. Lea, zwar bist du leider schon sehr früh gegangen, trotzdem habe ich so viel von dir gelernt! Ich bin froh, dich kennengelernt zu haben! Liebe Andrea, neben deiner großen Hilfe in der Praktikumsvorbereitung hattest du jederzeit ein offenes Ohr für mich, Dankeschön. Antje, Philipp und Wolfgang M. auch an euch ein herzliches Danke, ich konnte immer bei Fragen zu euch kommen. Auch den Sprengers danke ich sehr für die großartige Zeit im Lehrstuhl, wenn ich mal Ablenkung gebraucht habe, konnte ich zu euch rüberkommen! Vor allem mit dir Jan, habe ich die fachlichen und persönlichen Gespräche bei einer Tasse Kaffee sehr genossen, schön, dass wir fast zeitgleich unsere Arbeit hier begonnen haben. Ein ganz herzliches Dank auch an meine Studenten: Ronja, Johanna, Michelle, Valentina und Anna.

Jedoch ist man in der Arbeit nur so gut, wenn das Private hinter einem steht. Deshalb bin ich so froh, dich an meiner Seite zu haben, Markus. Du hast mich immer unterstützt, motiviert und aufgebaut! Du hast mir zugehört, Tipps gegeben und auf mich gewartet, wenn es mal wieder länger wurde. Ich konnte immer auf die zählen, danke! Liebe Kathrin und liebe Sonja, danke für eure offenen Ohren und die Gespräche, ich seid immer da, wenn ich euch brauche.

Alice, mein Schwesterherz vielen Dank, dass du dir die Zeit genommen und die Arbeit gelesen hast! Du hast mich mit deinen Worten wirklich sehr aufgebaut und immer Verständnis gezeigt, du bist ein toller Mensch. Und zu guter Letzt einen großen Dank an meine Eltern, die immer an mich geglaubt und mich jederzeit unterstützt haben. Ihr habt es mir möglich gemacht zu studieren und meinen Weg zu gehen. Es ist immer schön zu wissen, dass ihr da seid und ich auf euch zählen kann. Ohne euch hätte ich es nie soweit geschafft. Ich habe euch sehr lieb.