

**Untersuchung subzellulärer  
Metabolitverteilungen in der Hefe**  
*Saccharomyces cerevisiae*

**Inaugural Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Der Universität Köln

vorgelegt von

**Rolf Hecker**

Aus Ilshofen

Köln, Mai 2002

Druck: Copy Team Köln

## **Berichterstatter**

Prof. Dr. Reinhard Krämer  
Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 03.07.2002

## Kurzzusammenfassung

Die Vakuole des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* ist funktionell homolog zum Lysosom höherer Eukaryoten und ist neben der Funktion bei der Proteinhomeostase wichtig für zelluläre Regulationsprozesse, die Speicherung von Metaboliten und die Entgiftung verschiedener Kleinmoleküle und Ionen. Auffällig ist die sehr hohe Anreicherung vorwiegend basischer Aminosäuren in diesem zentralen Organell. Mit einer in dieser Arbeit entwickelten Methode zur selektiven Extraktion cytosolischer Metabolite, beruhend auf der Porenbildung mit Nystatin, konnte gezeigt werden, daß die Akkumulation von Aminosäuren in *batch*-Kulturen stark abhängig von der Wachstumsphase ist. Vor allem während des diauxischen *shifts* wurde eine verstärkte Synthese und Anreicherung in der Vakuole gefunden. Die *in vivo*-Mobilisierung basischer Speicheraminosäuren aus der Vakuole konnte bei gleichzeitiger Verlagerung aller Aminosäuren in das vakuoläre Lumen unter stickstofflimitiertem Wachstum auf Prolin und bei Stickstoffhunger gezeigt werden. Stickstoffgehungerte Kulturen, die auf Medium mit Ammonium überführt wurden, akkumulierten vor Erreichen eines neuen *steady state* große Mengen Arginin, Ornithin und Glutamin in der Vakuole.

Ein Ansatz zur Charakterisierung vakuolärer Transportprozesse ist die selektive Metabolitextraktion unter spezifischen physiologischen Bedingungen in Deletionsmutanten putativer Transportproteine im Vergleich zum Wildtyp. Die möglicherweise für Transporter codierenden ORFs im Hefegenom wurden anhand der Homologie zu bereits charakterisierten Genen identifiziert. Hier konnte gezeigt werden, daß dieser Ansatz in *S. cerevisiae* nur unter sehr spezifischen Bedingungen, möglicherweise nur durch dynamische Experimente, Erfolg verspricht. In 13 untersuchten Deletionsstämmen konnte kein Phänotyp beschrieben werden. Trotz der seit 1996 bekannten Sequenz des gesamten Genoms konnten erst während dieser Arbeit durch Russnak *et al.* (2001) die ersten Genloci für vakuoläre Aminosäuretransporter identifiziert werden.

Neben der Speicherung niedermolekularer Stoffe hat die Vakuole eine wichtige Funktion bei zellulären Regulationsprozessen. Erstmals konnte in dieser Arbeit eine Neusynthese von Aminosäuren und eine Verschiebung aus der Vakuole ins Cytosol bei Salzstreß beschrieben werden. Damit erniedrigt *Saccharomyces cerevisiae* bei hyperosmotischem Streß die Wasseraktivität im Cytoplasma durch Akkumulation vorwiegend basischer Aminosäuren. Auch nach Hitzeschock war eine Erhöhung des Gesamtgehalts metabolisch zentraler Aminosäuren zu beobachten. Gleichzeitig wurden Hinweise auf einen vakuolären Anteil des kosmotropen Zuckers Trehalose gefunden.

## Abstract

The vacuole of the model organism *Saccharomyces cerevisiae* is functionally homologous to the lysosome of higher eukaryotes and is, besides its function in protein homeostasis, important for cellular regulation processes, metabolite storage and detoxification of different small molecules and ions. Basic amino acids are remarkably accumulated inside this organelle. During this study a method for selective extraction of cytoplasmic metabolites based on the pore-forming action of nystatin was developed. Using this method, a strong dependence of amino acid accumulation on the growth state of cells in batch culture was observed. An increased synthesis and accumulation inside the vacuole was found especially during the diauxic shift. The *in vivo* mobilization of basic storage amino acids from the vacuolar lumen with a concomitant shift of all amino acids into this organelle was found under nitrogen limited growth on proline and under nitrogen deprivation. Nitrogen depleted cultures shifted to medium containing ammonia accumulated excess amounts of arginine, ornithine and glutamine inside the vacuole before reaching a new steady state.

One attempt to characterize vacuolar transport processes is the determination of subcellular metabolite distributions under defined physiological conditions in mutants, deleted in genes of putative transport proteins, compared to wild type cells. ORFs of the yeast genome likely to code for carriers were identified by sequence comparison with known genes. It is shown here, that this attempt is only promising under very specific conditions, maybe by performance of dynamic pool extraction experiments. Within 13 deletion mutants examined no phenotype was found. Despite the completely available genome sequence, Russnak and coauthors (2001) were the firsts to identify genes for vacuolar amino acid transporters parallel to this study.

Besides the storage of small solutes, the vacuole has important functions in cellular regulation processes. This work shows for the first time an enhanced synthesis and shift of amino acids from the vacuolar lumen to the cytosol under salt stress. Therefore *Saccharomyces cerevisiae* copes with hyperosmotic stress conditions by lowering the cytoplasmic water activity by accumulation of especially basic amino acids in the cytoplasmic pool. After heat shock, an increase in the total concentration of metabolically central amino acids was found as well. Concomitantly hints for a vacuolar sequestration of the osmoprotective sugar trehalose were found.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	BEDEUTUNG VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	1
1.2	ZELLKOMPARTIMENTIERUNG	1
1.3	DIE VAKUOLE IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	2
1.4	ZENTRALER STICKSTOFF- UND AMINOSÄUREMETABOLISMUS IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (CNM)	4
1.5	STICKSTOFF-KATABOLITREPRESSION (NCR)	7
1.6	METABOLITSENSOREN	9
1.7	STREßMETABOLISMUS	10
1.7.1	<i>Stickstoffhunger</i>	11
1.7.2	<i>Hitzeschock</i>	11
1.7.3	<i>Osmotischer Streß</i>	12
1.8	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	HEFESTÄMME, NÄHRMEDIEN UND CHEMIKALIEN	14
2.1.1	<i>Nährmedien und Kultivierungsbedingungen</i>	17
2.1.2	<i>Chemikalien</i>	18
2.2	BESTIMMUNG DER BIOTROCKENMASSE (BTM)	18
2.3	BESTIMMUNG DER VITALITÄT	19
2.3.1	<i>Bestimmung der colony forming units (CFU)</i>	19
2.3.2	<i>Vitalfärbung nach Sivadon et al. (1997)</i>	19
2.4	SELEKTIVE EXTRAKTION CYTOSOLISCHER METABOLITE	19
2.4.1	<i>CuCl<sub>2</sub>-Methode nach Ohsumi et al. (1988)</i>	19
2.4.2	<i>Selektive Permeabilisierung mit Nystatin</i>	20
2.4.3	<i>Cytochrom c-Methode nach Dubois und Wiame (1978)</i>	20
2.5	SCHNELLE PROBENNAHME	21
2.6	ISOLIERUNG INTAKTER VAKUOLEN NACH WIEMKEN UND DÜRR (1974)	21
2.7	METABOLITANALYSE	23
2.7.1	<i>HPLC-Analyse von Aminosäuren</i>	23
2.7.1.1	<i>OPA-Mercaptoethanol-Derivatisierung</i>	23
2.7.1.2	<i>OPA-Mercaptopropionsäure/ FmocCl-Derivatisierung</i>	25
2.7.2	<i>HPLC-Analyse von Polyaminen</i>	26
2.7.3	<i>HPLC-Analyse von Nukleotiden</i>	27
2.7.3.1	<i>Isokratische Trennung</i>	27
2.7.3.2	<i>Trennung modifiziert nach Patthy et al. (1990)</i>	27
2.7.4	<i>HPLC-Analyse von Bernsteinsäure</i>	28
2.7.5	<i>GC-Analyse von Polyolen</i>	28
2.8	ENZYMATISCHE BESTIMMUNG VON ATP	29
2.9	ENZYMATISCHE GLUCOSEBESTIMMUNG	30
2.10	PHOSPHATBESTIMMUNG	30
2.11	BESTIMMUNG VON KALIUMIONEN	31
2.12	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	31
2.13	BERECHNUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	31

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
3.1	SELEKTIVE PERMEABILISIERUNG MIT NYSTATIN	34
3.1.1	<i>Selektive Nystatindosis</i>	34
3.1.2	<i>Permeabilisierungskinetik</i>	38
3.1.3	<i>Abhängigkeit der Nystatinwirkung von den Kulturbedingungen</i>	40
3.1.3.1	Stationäre Kulturen	40
3.1.3.2	Stickstoffmangelkulturen	42
3.1.3.3	Hitze-, Kälte- und hyperosmolare Kulturen	44
3.1.4	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	44
3.1.5	<i>Stammabhängigkeit der Permeabilisierung mit Nystatin</i>	46
3.2	UNTERSUCHUNG VON DELETIONSSTÄMMEN	46
3.2.1	<i>AAAP-Familie</i>	46
3.2.2	<i>Deletion im ORF YCR023c</i>	48
3.2.3	<i>ORF YGR138c und YNL065w</i>	50
3.2.4	<i>ORF YMR126c</i>	50
3.3	DYNAMISCHE MESSUNGEN DER AMINOSÄUREVERTEILUNG	53
3.3.1	<i>Aminosäureverteilung und Wachstum</i>	53
3.3.2	<i>Shift-Experimente</i>	58
3.3.3	<i>Dynamische Messungen der Deletionsmutante ME020</i>	63
3.4	ABSCHÄTZUNG DER MITOCHONDRIALEN AMINOSÄUREKONZENTRATION	65
3.5	BESTIMMUNG KOMPATIBLER SOLUTE	67
3.5.1	<i>Wachstum der trehalasefreien Mutante</i>	68
3.5.2	<i>Salzstreß</i>	68
3.5.3	<i>Hitzeschock</i>	71
3.5.4	<i>Isolierung intakter Vakuolen</i>	75
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>78</b>
4.1	ETABLIERUNG EINER METHODE ZUR SELEKTIVEN METABOLITEXTRAKTION	78
4.2	DYNAMISCHE MESSUNGEN DER AMINOSÄUREVERTEILUNG	81
4.2.1	<i>Abhängigkeit der Aminosäureverteilung vom Wachstumsstadium</i>	81
4.2.2	<i>Downshift auf L-Prolin</i>	84
4.2.3	<i>Downshift auf Medium ohne Stickstoffquelle</i>	86
4.2.4	<i>Überführen stickstoffgehungelter Kulturen auf Ammonium</i>	89
4.3	CHARAKTERISIERUNG VON DELETIONSMUTANTEN	91
4.4	VAKUOLÄRE TRANSPORT UND STREß	93
4.4.1	<i>Hyperosmolare Bedingungen</i>	94
4.4.2	<i>Hitzeschock</i>	95
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>100</b>
6.1	CBS-MEDIUM NACH VERDUYN <i>ET AL.</i> (1992):	100
6.1.1	<i>Standardzusammensetzung</i>	101
6.2	PERMEABILISIERUNGSKINETIK	102
6.3	DYNAMISCHE BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREVERTEILUNGEN	105
6.3.1	<i>Shift auf 10 mM L-Prolin</i>	105
6.3.2	<i>Shift auf Medium ohne Stickstoffquelle</i>	110
6.3.3	<i>Dynamische Studien der Deletionsmutante ME020</i>	114
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>122</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Arg-CMAC	7-L-Argininamido-4-chloromethylcoumarin
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Brij® 35	Polyethylenglykolmonostearylester
BTM	Biotrockenmasse
cAMP	3'-5'-cyclo-AMP
CFU	<i>colonie forming unit</i>
CNM	<i>central nitrogen metabolism</i> (zentraler Stickstoffmetabolismus)
Cit	Citrullin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
EDTA	N, N, N', N'-Ethyldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FID	Flammenionisationsdetektor
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
GABA	4-Aminobutansäure
GC	Gaschromatographie
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
3xHA	3xHämaggglutininepitop, Genkonstrukt zur immunologischen Markierung von unbekanntem Proteinen
HAP	<i>heme activator protein</i>
HEPES	Hydroxyethylpropansulfonsäure
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
HSE	<i>heat shock element</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NAD-GDH	NADH-abhängige Glutamatdehydrogenase
NADPH-GDH	NADPH-abhängige Glutamatdehydrogenase

-Abkürzungsverzeichnis-

---

NCR	<i>nitrogen catabolite repression</i> (Stickstoff-Katabolitrepession)
OPA	o-Phtaldialdehyd
ORF	<i>open reading frame</i>
Orn	Ornithin
PDSE	<i>post diauxic shift element</i>
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
P5C	Pyrrolin-5-Carboxylat
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase(n)-)
Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s	Standardabweichung
SP(M)E	<i>solid phase (micro) extraction</i> Festphasen-(mikro) extraktion
STRE	<i>stress responsive element</i>
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TCA	Trichloracetat
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS-	Trimethylsilyl-
TRIS	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol

Physikalische und chemische Einheiten werden nach dem Système International d'Unités (SI) bezeichnet.

Aminosäuren werden mit den international gebräuchlichen Dreibuchstabencodes oder Einbuchstabencodes abgekürzt, die nicht-Standard-Aminosäuren Ornithin und Citrullin werden mit Orn und Cit bezeichnet.

Gene und Proteine werden nach der in der Literatur gängigen Nomenklatur für Hefe bezeichnet. Dabei handelt es sich bei Abkürzungen um Proteine, wenn ein „p“ hinter dem Genkürzel steht.

Um Unklarheiten zu vermeiden werden in dieser Arbeit gängige Fachausdrücke aus dem Englischen übernommen, wenn es keine deutsche Entsprechung gibt oder diese nicht gebräuchlich ist.

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und deren nächste Verwandte, *S. vini* und *S. carlsbergensis*, die zur Klasse der Ascomyceten (Abteilung Eumycota, „echte Pilze“) gehören, zählen zu den technologisch am intensivsten genutzten Mikroorganismen und haben mit einer Jahresproduktion von etwa 1,5 Millionen Tonnen (Hamlyn 1998) große wirtschaftliche Bedeutung. Grundlage für diese Nutzung ist der biphasische Metabolismus der Bäckerhefe bei Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Zunächst werden fermentativ große Mengen Ethanol produziert, die erst bei Verarmung der Kohlenstoffquelle respirativ metabolisiert werden (Bijkerk und Hall 1977, Jones und Kompala 1999). Ist die wirtschaftliche Nutzung schon seit Jahrhunderten bekannt, hat sich *Saccharomyces cerevisiae* heute auch zu einem der wichtigsten Modellorganismen für die eukaryotische Zellbiologie entwickelt. Mit der kompletten Sequenzierung des Genoms, das mit nur etwa 6200 *open reading frames* (ORFs) für Eukaryoten unerwartet klein ist, wurde 1996 eine neue Dimension in der biologischen Grundlagenforschung eröffnet (Goffeau *et al.* 1996, Goffeau *et al.* 1997). Ziel ist es nun, in *Saccharomyces cerevisiae* als erstem Eukaryoten eine Zuordnung aller Gene zu zellulären Funktionen zu erreichen und so den Grundstein zu einem umfassenden Verständnis der komplexen Funktionen dieses Organismus zu legen. Dies wird durch die im Vergleich zu anderen Modellorganismen einfache genetische Manipulierbarkeit von *Saccharomyces* im haploiden Laborsystem erleichtert.

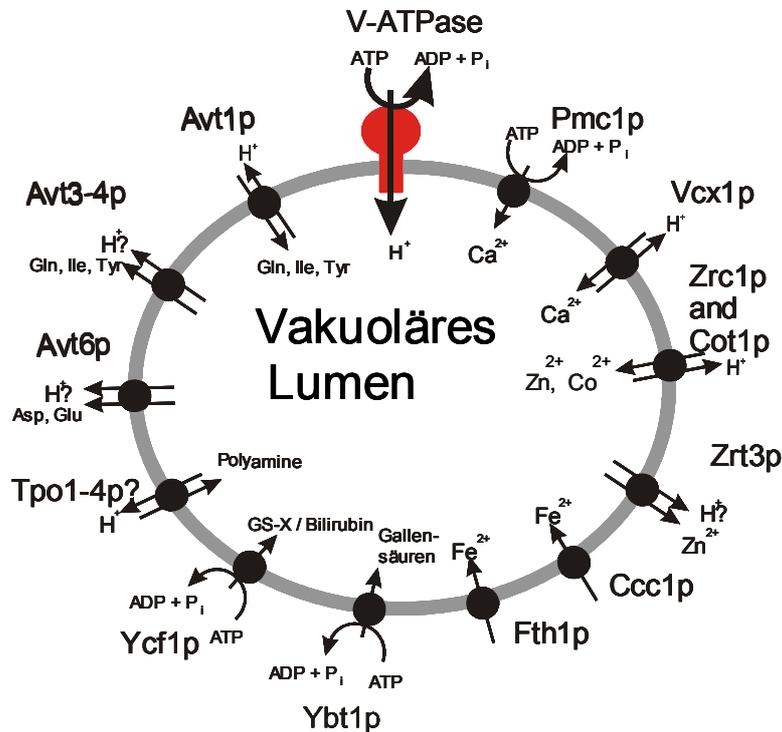
## 1.2 Zellkompartimentierung

Die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen dient vor allem dazu, den Metabolismus in verschiedene Reaktionsräume zu unterteilen und so eine komplexe Regulation des Stoffwechsels zu ermöglichen. Dabei werden unterschiedliche chemische Milieus für die jeweiligen Stoffwechselzweige geschaffen. Gleichzeitig wird das Verhältnis von Membranoberfläche zu Volumen in der Zelle erhöht, da viele essentielle Stoffwechselfunktionen membranassoziiert stattfinden. Damit werden aber auch mannigfaltige Transportprozesse notwendig. Hierzu zählen die vesikuläre Sortierung von Proteinen (Harter und Reinhard 2000) und Lipiden (Daum *et al.* 1998), sowie der direkte Transport kleiner Metabolite über Membranen. Durch die Kompartimentierung niedermolekularer Metabolite kann die Regulation von Biosynthese- und Abbauwegen nicht

nur durch die Aktivität der beteiligten Enzymsysteme reguliert werden, sondern es ergibt sich die Möglichkeit der Regulation der Verteilung bei Anwesenheit anaboler und kataboler Enzymsysteme. Ein Beispiel ist die Trennung des anabolen Zweigs des Harnstoffzyklus (Carbamoylphosphatsynthese und –übertragung auf Ornithin) in Mitochondrien vom katabolen Anteil (Arginase) in vielen Organismen (siehe auch 1.4). Da der Transport über Membranen meist sekundär an ein Cosubstrat oder direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, wird eine weitere Regulationsmöglichkeit geschaffen.

### **1.3 Die Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae***

Die Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae* ist homolog zum Lysosom höherer Eukaryoten (Matile und Wiemken 1967, Jones *et al.* 1997). Unter Hungerbedingungen findet etwa 85 % des Gesamtproteinabbaus in der Vakuole statt, wo 40 % der Gesamtzellproteine in 24 Stunden abgebaut werden können (Thumm 2000). Speziell Membranproteine werden nach Monoubiquitinierung und Endozytose in der Vakuole abgebaut. Neben dem Proteinumsatz spielt die Vakuole eine Rolle bei der Regulation der cytosolischen pH- und Ionenhomöostase (Klionsky 1990, Bertl und Slayman 1990, Nass und Rao 1999, Förster und Kane 2000), bei Entgiftungsprozessen (Bauer *et al.* 1999) und der Speicherung von Metaboliten. Ionen (Wada und Anraku 1994), Polyamine (Kakinuma *et al.* 1992), Gallensäuren (Petrovic *et al.* 2000) und Aminosäuren (Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988) werden unter physiologischen Bedingungen in hoher Konzentration im vakuolären Lumen akkumuliert (siehe Abbildung 1). Energetisiert wird der Transport meist durch die vakuoläre V-ATPase, die strukturell homolog zur mitochondrialen F-ATPase ist und einen Gradienten von bis zu 1,7 pH-Einheiten und +180 mV Innen über die vakuoläre Membran, auch Tonoplast genannt, erzeugen kann (Kakinuma *et al.* 1981). Neben sekundären Transportern sind auch zwei ABC-Transporter, die den Transport direkt an die Hydrolyse von ATP koppeln (Jones und George 2000), im Tonoplasten charakterisiert. Beide haben Entgiftungsfunktion (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Schema der bekannten vakuolären Transportproteine für niedermolekulare Metabolite und Ionen. GS-X = Glutathionkonjugate.

Der Aminosäuremetabolismus in *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Musterbeispiel für die Nutzung der Kompartimentierung zur Trennung von Biosynthese, Abbau und Speicherung. Die Vakuole dient dabei als metabolisch inaktiver Stickstoffspeicher, in den vorwiegend basische Aminosäuren, energetisiert durch den von der vakuolären ATPase generierten Protonengradienten, sequestriert werden. Allerdings findet in der Vakuole ein aktiver Umsatz durch Proteolyse statt, so daß ein Teil der Metabolite im Lumen aus dynamischen Umsatzprozessen von Makromolekülen stammen. Schon 1974 konnten Boller *et al.* (1974) eine aktive Aufnahme von Arginin in intakte Vakuolen zeigen. Basierend auf Transportstudien an vakuolären Vesikeln postulierten Sato *et al.* (1984 a/ b) sieben Aminosäure-Proton-Antiporter und einen Arginin-Histidin-Antiport im Tonoplasten. Erst kürzlich konnten Russnak *et al.* (2001) die Gene für ein vakuoläres Glutamin-/ Tyrosin-/ Isoleucinimportprotein (Avt1p) als Mitglied der AAAP-Transporterfamilie (André 1997, Young *et al.* 1999), zu der auch die neuronalen vesikulären GABA-Glycin-Transporter zählen, identifizieren.

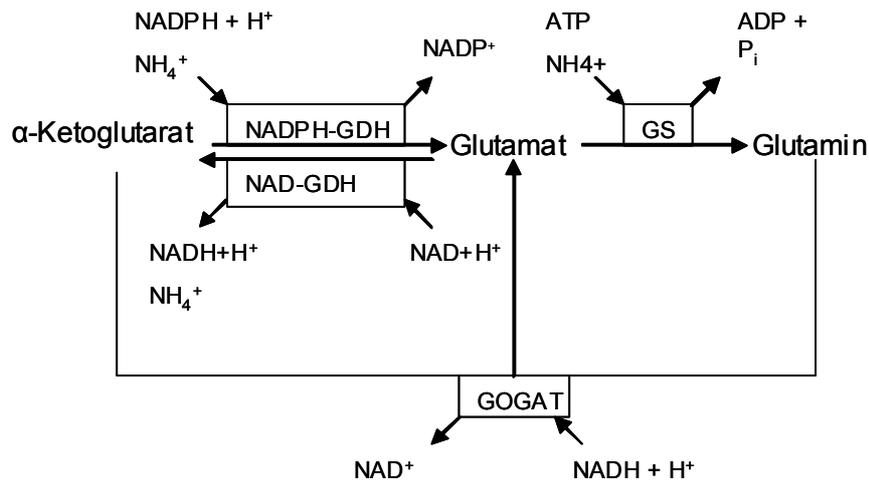
Im vakuolären Lumen müssen die bis zu etwa 0,4 M angereicherte Aminosäuren (Kitamoto *et al.* 1988) osmotisch inaktiv vorliegen, da als Konsequenz der hohen Metabolitkonzentration die Wasseraktivität geringer wäre als im Cytosol und die Vakuole durch Wassereinstrom stark anschwellen würde. Daher vermuteten Dürr *et al.* (1979) eine Bindung basischer Aminosäuren an Polyphosphat, das ebenfalls in der Vakuole angereichert ist. Weiterhin sind ionische Austauschprozesse an der Volumen- pH- und Osmoregulation der Vakuole beteiligt, deren Mechanismen bisher nur ansatzweise verstanden sind (Latterich und Watson 1991, Calahorra *et al.* 1998, Nass und Rao 1999, Serrano *et al.* 1999).

Neben dem vakuolären Anteil existiert ein mitochondrialer Aminosäureanteil, da in diesem Organell neben der Proteinsynthese auch wichtige Reaktionen des zentralen Aminosäurestoffwechsels stattfinden (Jauniaux *et al.* 1978, Cooper 1982). Im cytosolischen Anteil wurden vor allem Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat gefunden, die einen schnellen metabolischen Umsatz zeigen (Wiemken und Dürr 1974, Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988).

Obwohl schon vielfältige vakuoläre Aufnahmesysteme für Kleinmoleküle beschrieben sind, konnten Exportmechanismen bisher nur rudimentär beschrieben werden. Russnak *et al.* (2001) konnten kürzlich einen Verlust des ATP-abhängigen Exports von Glutamat und Aspartat aus vakuolären Vesikeln eines *avt6*-Deletionsstammes und eine Überakkumulation von Glutamin, Isoleucin und Tyrosin in vakuoläre Vesikel, isoliert aus *avt3/4*-Deletionsstämmen, zeigen. Die Mobilisierung basischer Aminosäuren aus der Vakuole unter Stickstoffmangelbedingungen wurde *in vivo* durch differentielle Extraktion mit Kupferchlorid gezeigt (Kitamoto *et al.* 1988, Messenguy *et al.* 2000).

## **1.4 Zentraler Stickstoff- und Aminosäuremetabolismus in Saccharomyces cerevisiae (CNM)**

Metabolite, die Stickstoff in verwertbarer Form enthalten, werden anhand ihrer Auswirkungen auf die Teilungsrate als gute Stickstoffquellen (Ammonium, Glutamin, Asparagin) oder schlechte Stickstoffquellen (z.B. Harnstoff, Prolin) bezeichnet. Um eine Verbindung als Stickstoffquelle zu nutzen, muß *Saccharomyces cerevisiae* daraus Glutamat oder Glutamin synthetisieren (Cooper 1982, ter Schure *et al.* 2000, Abbildung 2). Aus diesen beiden Aminosäuren können alle Stickstoff enthaltenden Komponenten der Zelle hergestellt werden (Magasanik 1992).

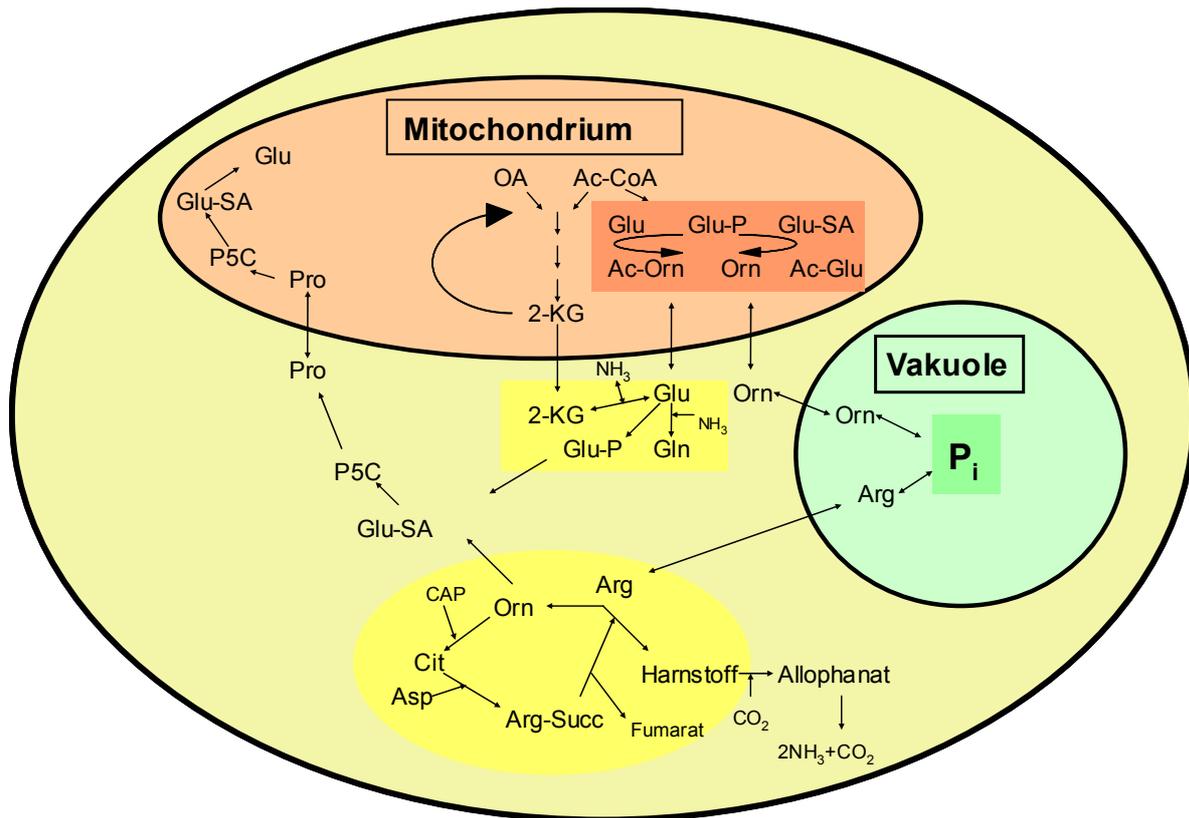


**Abbildung 2** Zentraler Stickstoffmetabolismus in *Saccharomyces cerevisiae*. NADPH-GDH = NADPH-abhängige Glutamatdehydrogenase, NAD-GDH = NAD-abhängige Glutamatdehydrogenase, GS = Glutaminsynthetase, GOGAT = Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase. Nach ter Schure *et al.* 2000.

Glutamat kann NADPH-abhängig aus Ammonium und dem Tricarbonsäurezyklus-Intermediat 2-Ketoglutarat synthetisiert werden (NADPH-GDH). Durch die Glutaminsynthetase kann ATP-abhängig ein weiteres Stickstoffäquivalent unter Bildung von Glutamin fixiert werden. Bei Wachstum auf Glutamin kann dieses  $\text{NAD}^+$ -abhängig durch GOGAT in Glutamat umgewandelt werden (Sóberon und González 1987). Gleichzeitig kann aus Glutamin und Asparagin Ammonium direkt durch Glutaminasen und Asparaginasen freigesetzt werden (Sinclair *et al.* 1994). Das Zusammenwirken von Glutaminsynthetase und GOGAT ist der Hauptstickstoffassimilationsweg in Bakterien und Pflanzen (Chock *et al.* 1985, Holmes *et al.* 1991). In *Saccharomyces* ist die physiologische Funktion des GS/ GOGAT-Systems noch nicht verstanden. Die Wichtigkeit der GOGAT, in Bakterien der regulatorische Kreuzungspunkt von Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus, wurde für *Saccharomyces cerevisiae* wahrscheinlich lange Zeit unterschätzt (van Riel 2000, ter Schure *et al.* 2000).

Harnstoff wird zunächst biotinabhängig zu Allophanat carboxyliert und zu Ammonium und  $\text{CO}_2$  abgebaut. Prolin wird in mehreren Schritten im Mitochondrium zu Glutamat katabolisiert (Cooper 1982, Krzywicki und Brandriss 1984, Brandriss und Krzywicki 1986). Bei Wachstum auf Prolin wird dieses durch die allgemeine Aminosäurepermease (Gap1p) und die Prolinpermease (Put4p) in die Zelle aufgenommen und weiter in die Mitochondrien transportiert, wo es zunächst zu  $\delta$ -1-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) oxidiert wird. Diese Zwischenstufe hydrolysiert spontan unter Ringöffnung zum Glutamat-5-Semialdehyd, welches durch die P5C-Dehydrogenase zu Glutamat oxidiert wird. Dieses kann im

Mitochondrium nach Acetylierung in Ornithin überführt werden, das im, in vorzugsweise fermentierenden Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, komplett cytosolischen Harnstoffzyklus zu Citrullin und Arginin umgesetzt werden kann. Ein Glutamatttransporter ist in *Saccharomyces*-Mitochondrien noch nicht charakterisiert, in Säugermittochondrien kann dieses über den Glutamat-Aspartat-Antiporter (Palmieri *et al.* 2001), einen Teil des NADH-*shuttle*-Systems, oder einen kürzlich charakterisierten Glutamatcarrier (Fiermonte *et al.* 2002) in die Mitochondrien transportiert werden. Ornithin wird wahrscheinlich durch den Protonantiporter Ort1p (früher Arg11p) aus den Mitochondrien exportiert (Palmieri *et al.* 1997). Damit sind die Komponenten des zentralen Stickstoffmetabolismus (CNM) direkt mit dem Metabolismus der wichtigsten Speicheramino­säure Arginin verknüpft. Die Intermediate des Harnstoffzyklus, Arginin, Ornithin und Citrullin, akkumulieren bei guter Stickstoffversorgung in hoher Konzentration in der Vakuole (Wiemken und Dürr 1974, Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988). Um bei Wachstum auf Arginin den anabolen Teil des Harnstoffzyklus zu hemmen, bindet die Arginase bei Anwesenheit von Ornithin und Arginin reversibel an die Ornithincarbamoyltransferase und deaktiviert diese (Jauniaux *et al.* 1978). Bei schlechter Stickstoffversorgung kann Arginin cytosolisch durch Arginase zu Ornithin und durch die Ornithinaminotransferase weiter zum P5C abgebaut werden (Jauniaux *et al.* 1978). Aus Ornithin synthetisiertes P5C wird zunächst durch die P5C-Reduktase zu Prolin reduziert und dann mitochondrial zu Glutamat abgebaut. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, da die P5C-Dehydrogenase nur bei Anwesenheit von Prolin aktiv ist, ein wichtiger Teil der Regulation des Prolinkatabolismus (Brandriss und Magasanik 1979/ 1980, Krzywicki und Brandriss 1984, Brandriss und Krzywicki 1986). In der inneren mitochondrialen Membran wurde außerdem ein elektroneutral arbeitender Antiporter für basische Aminosäuren gefunden, der eine Aufnahme von Arginin, Ornithin und Lysin in Mitochondrien ermöglicht (Soetens *et al.* 1998). Die physiologische Funktion dieses Transporters ist noch unklar, wahrscheinlich ermöglicht er jedoch den Import von Arginin zur allosterischen Inhibition der eigenen Biosynthese. Eine schematische Übersicht über diese Stoffwechselwege und ihre Kompartimentierung ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3** Übersicht über die Kompartimentierung der wichtigsten Aminosäurestoffwechselwege in *Saccharomyces cerevisiae*. Die metabolischen Zusammenhänge sind nur schematisch wiedergegeben, Pfeile sind nicht als Reaktionspfeile zu verstehen. Viele der mitochondrialen Transportprozesse sind noch nicht genauer charakterisiert. Ac-CoA = Acetyl-CoenzymA; Ac-Glu = N-Acetylglutaminsäure, Ac-Orn = N-Acetylmithin, Arg-Succ = Argininosuccinat, CAP = Carbamoylphosphat, Glu-SA = Glutaminsäure-5-Semialdehyd, Glu-P = Glutaminsäure-5-Phosphat, 2-KG = 2-Oxoglutarat, OA = Oxalacetat,  $P_i$  = Polyphosphat.

### 1.5 Stickstoff-Katabolitrepression (NCR)

Da aus gut verwertbaren Stickstoffquellen (1.4) in *Saccharomyces cerevisiae* direkt alle stickstoffhaltigen Metabolite synthetisiert werden können, besitzt die Bäckerhefe ein Regulationsnetzwerk, das die Aufnahme und den Katabolismus schlecht verwertbarer Stickstoffquellen bei Verfügbarkeit besser metabolisierbarer Stickstoffquellen inhibiert. Diese auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene wirkende Regulation wird als Stickstoff-Katabolitrepression (*nitrogen catabolite repression*, NCR) bezeichnet und ist stark stammabhängig (Übersichtsartikel Wiame *et al.* 1986, ter Schure *et al.* 2000). Bei Wachstum auf gut verwertbaren Stickstoffquellen werden die generelle Aminosäurepermease Gap1p und die Prolinpermease Put4p ubiquitiniert und durch Endozytose zum Abbau in die Vakuole transportiert. Dieser Mechanismus wird bei Gap1p durch Dephosphorylierung des aktiven Transporters gesteuert. Dagegen sind die Permeasen mit niedriger Kapazität für basische Aminosäuren, Hip1p, Lyp1p und Can1p, konstitutiv aktiv.

Auf transkriptioneller Ebene wird die Repression des Prolinkatabolismus durch eine Verringerung der Prolinkonzentration erreicht. Prolin aktiviert direkt den Transkriptionsfaktor Put3p, was zu einer Aktivierung der Expression der abbauenden Enzyme Prolinoxidase und P5C-Dehydrogenase (Put1p, Put2p) führt.

Die transkriptionelle Steuerung weiterer NCR-regulierter Gene wird vor allem durch Transkriptionsfaktoren erreicht, die alle UAS<sub>NTR</sub>-Elemente (*upstream activating sequence-nitrogen regulated*) oder URS<sub>GATA</sub>-Elemente (*upstream repressing sequence* mit dem Nukleotidmotiv GAT(T/ A)A) in Promotoren der regulierten Gene binden. Dazu zählen die aktivierenden Regulatoren Gln3p und Nil1p (Gat1p), sowie die reprimierenden Proteinkomplexe Dal80p/ Uga43p und Deh1p/ Gzf3p/ Nil2p/ YJL110cp. Die Expression von Gln3p, Nil1p und Gat1p wird durch das Protein Ure2p, das in falscher Konformation ein Prionprotein (Ure3p) ist, über UAS<sub>NTR</sub>-Elemente reprimiert. Die Expression des Transkriptionsfaktors Dal80p wird ebenfalls über UAS<sub>NTR</sub>-Elemente reguliert. Die Regulation wird durch das Zusammenspiel dieser Faktoren bei Binden der Promotorregionen sehr komplex. Edskes *et al.* (1999) vermuteten, daß der Faktor Mks1p (identisch mit Lys80p, einem negativen Regulator der Lysinbiosynthese) ein *upstream*-Regulator von Ure2p ist. Kuruvilla *et al.* (2001) konnten eine Regulation der aktivierenden Faktoren Gln3p und Nil1p durch die Tor-Proteinkinasen (*target of rapamycin*) zeigen. Durch eine systematische Suche nach den Konsensussequenzen für NCR-regulierte Gene in Promotoren des gesamten Hefegenoms wurde eine Vielzahl potentieller Zielgenen der NCR gefunden. Dazu zählen Gene von Permeasen (Gap1p, Ammoniumpermease/ -sensor Mep2p), Gene von Enzymen des Aminosäurestoffwechsels (z.B. NADP-GDH) und Gene verschiedener unverwandter Proteine (ter Schure *et al.* 2000). Kürzlich wurde durch ein *Microarray-screening* Ure2p-bindender synthetischer Kleinmoleküle ein Effektor entdeckt, der spezifisch eine Nil1p-abhängige Induktion von Genen des anaplerotischen Glucosestoffwechsels durch Bindung von Ure2p auslöst. Dieser von Ure2p gesteuerte Stoffwechselzweig korreliert, im Gegensatz zu ammoniumvermittelten Wirkungen, mit dem Phosphorylierungsstatus des Effektors (Kuruvilla *et al.* 2002).

Gesteuert wird diese komplexe Regulation durch die Konzentration von Ammonium (ter Schure *et al.* 1998). Der primäre Sensor für die NCR ist bisher nicht bekannt, als Sensor für extrazelluläres Ammonium wird aber die hochaffine Ammoniumpermease Mep2p diskutiert (Forsberg und Ljungdahl 2001b). Wahrscheinlich aktiviert dieser Transporter bei Stickstoffmangel das GTP-bindende Protein Ras2p. Dieses aktiviert eine MAP-Kinasekaskade zum Zinkfingerprotein Ste12p, das als nukleärer Effektor an FRE-Elemente

(*filamentation and invasive response* element) bindet (Gancedo 2001, Hohmann 2002). Gleichzeitig kann über Ras2p auch eine Aktivierung eines cAMP-abhängigen Signaltransduktionswegs erfolgen (Gancedo 2001). Diese Signale führen in diploiden Zellen zu einer Bildung pseudohyphaler Strukturen, einer Reaktion auf die Nährstoffversorgung, die stark stammabhängig ist. Bei haploiden wird invasives Wachstum auf Agarplatten mit Vollmedium beobachtet (Gancedo 2001).

## **1.6 Metabolitsensoren**

Lange Zeit wurde angenommen, daß *S. cerevisiae* vor allem intrazelluläre Sensoren zur Regulation des Metabolismus benutzt. Neben dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Membransensor für Ammonium, Mep2p, wurden in den letzten Jahren aber mehrere membranständige Metabolitsensoren mit starker Homologie zu Importcarriern beschrieben (Übersichtsartikel Forsberg und Ljungdahl 2001b). Dazu zählen die Sensoren für extrazelluläre Glucose, Snf3p, Rgt2p und der G-Protein gekoppelte Rezeptor Gpr1p, der bei Glucoseanstieg in der Umgebung gehungerter Zellen eine drastische Erhöhung des cAMP-Spiegels auslöst.

Das extrazelluläre Aminosäureangebot wird von *Saccharomyces cerevisiae* über den SPS-Sensorkomplex wahrgenommen: Der primäre Sensor ist Ssy1p, ein transportkompetentes, schwach exprimiertes Mitglied der AAP-Aminosäuretransporterfamilie. Ptr3p ist ein peripheres Protein der Plasmamembran und bildet wahrscheinlich eine Erkennungsstelle für die allosterische Regulation des Komplexes. Auch Ssy5p ist ein peripheres Protein, das mit der Plasmamembran assoziiert. Dieser Sensorkomplex ist für die Transkription von Genen des Aminosäurestoffwechsels notwendig, wird aber nach Aktivierung durch Bindung von Aminosäuren sehr schnell modifiziert und herunterreguliert (Forsberg und Ljungdahl 2001a/ b). Neben der Induktion spezifischer Aminosäuretransporter reprimiert der SPS-Komplex die generelle Aminosäurepermease Gap1p, induziert die Arginase Car1p und die NAD-abhängige Glutamatdehydrogenase Gdh2p, sowie eine Vielzahl weiterer Gene. Interessant ist die Aktivierung der Transkription der NCR-regulierenden Transkriptionsfaktoren Dal80p und Nil1p (siehe 1.5). Durch die Analyse von SPS-Sensormutanten wurde auch ein Einfluß des Sensors auf die Kompartimentierung zwischen Cytosol und Vakuole gefunden (Forsberg und Ljungdahl 2001a).

Neben den membranständigen Rezeptoren sind auch intrazellulär wahrgenommene Regulationsphänomene bekannt. Dazu zählt ein Teil der Glucoserepression, wobei der allgemeine Regulator Snf1p, eine Threonin-Serin-Proteinkinase, durch Glucose-6-Phosphat

aktiviert wird. Der primäre Sensor ist nicht bekannt, ist aber metabolisch hinter der Hexokinasereaktion angeordnet (Gancedo 1998).

Die Aminosäurebiosynthese steht unter einer sogenannten generellen Aminosäurekontrolle. Nimmt die Zelle eine zu geringe Konzentration einer Aminosäure wahr, so werden über den zentralen Transkriptionsfaktor Gcn4p über 40 Gene des gesamten Aminosäurestoffwechsels reguliert (Hinnebusch 1988). Sensor für diesen Prozess ist die Proteinkinase Gcn2p, die über eine Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 Gcn4p translational aktiviert (Hinnebusch 1997). Neben dieser generellen Kontrolle gibt es eine Vielzahl von Regulationen innerhalb und zwischen den Biosynthesewegen (Dickinson und Schweizer 1999). Dabei können spezifische Kontrollmechanismen einzelner Stoffwechselwege die generelle Kontrolle ausschalten. Eine Erhöhung des Gehalts aromatischer und basischer Aminosäuren bei der generellen Derepression biosynthetischer Gene wurde beschrieben (Hinnebusch 1988).

## **1.7 Streßmetabolismus**

Mikroorganismen sind in ihrer natürlicherweise sehr variablen Umwelt verschiedenen Streßbedingungen ausgesetzt, zu deren Bewältigung sie mannigfaltige Schutzsysteme entwickelt haben. Typische wechselnde Umweltbedingungen sind die Verfügbarkeit von Nährstoffen, die Temperatur, die Osmolarität in der Umgebung der Zelle, toxische Substanzen und oxidativer Streß, sowie UV-Strahlung. Oft wird bei der Anpassung an Streßfaktoren eine induzierte Toleranz beobachtet, das heißt eine kurzzeitige schwache Streßexposition führt zu einer erhöhten Toleranz gegen diese und andere Umweltbedingungen (Übersichtsartikel Estruch 2000). Typische unspezifische Schutzmechanismen sind die Synthese von Hitzeschockproteinen und die Erhöhung der Katalaseaktivität durch Induktion des *CTTI*-Gens. Eine generelle Streßantwort wird über die sogenannten *stress responsive elements* (STREs) in Promotoren der Zielgene vermittelt. Die Expression dieser Zielgene wird über den cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signaltransduktionsweg, der auch bei der Regulation des Zentralstoffwechsels große Bedeutung hat, negativ reguliert. Ein aktivierender Rezeptor dieses Signaltransduktionsweges ist der Glucosesensor Gpr1p. Neben den STREs sind *heat shock elements* (HSEs) und *post diauxic shift elements* (PDSE) typische Sequenzen in Promotoren streßregulierter Gene, wodurch eine große Diversität bei der Expression entsteht. Die Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p binden an STREs, und ihre Lokalisation wird durch die gegenläufigen Signaltransduktionswege (cAMP-PKA-Weg und Streßsignale), wahrscheinlich über den Faktor Msn5p, gesteuert. Typische Zielgene bei der generellen Streßantwort sind Gene des Kohlenstoffmetabolismus, Transporter, Proteasen und

Gene mit Schutzfunktion, wie das des Hitzeschockproteins Hsp104p, der Katalase Ctt1p und des Trehalosemetabolismus (Gasch *et al.* 2000, Causton *et al.* 2001).

### **1.7.1 Stickstoffhunger**

Bei Stickstoffhunger wird neben der Bildung von Pseudohyphen und einem Eintritt in die G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Forsberg und Ljungdahl 2001) ein Einsetzen von Makroautophagie beobachtet (Scott *et al.* 1996). Dabei wird ein Teil der cytoplasmatischen Proteine und Organellen (Pexophagie) in Autophagosomen, von einer Doppelmembran umschlossene Vesikel, aufgenommen, und zum Abbau in die Vakuole transportiert. Dieser vakuoläre Transportweg wird durch die Komponenten gesteuert, die auch konstitutiv für den Transport cytoplasmatischer Proteine in die Vakuole (Cvt-Weg) verantwortlich sind (Scott *et al.*, Baba *et al.* 1997). Ein essentieller Schritt bei der Vesikelbildung ist die ubiquitinähnliche Kopplung des Proteins Apg5 an Apg12p durch das Enzym Apg10p (George *et al.* 2000).

### **1.7.2 Hitzeschock**

Bei einer Temperaturerhöhung von 25 °C auf 38 °C wurde die Induktion von mindestens 52 Proteinen beobachtet (Boy-Marcotte *et al.* 1999). Neben STREs in Promotoren hitzeschockinduzierter Gene wurden HSEs (*heat shock elements*) beschrieben, die durch das DNA-bindende Protein Hsf1p reguliert werden (Übersichtsartikel Estruch 2000). Mechanistisch wird unter anderem die Veränderung der Chromatinstruktur bei erhöhten Temperaturen und eine damit verbundene erhöhte Affinität des Transkriptionsfaktors zu HSEs diskutiert. Auch eine Veränderung der Bindungsaffinität von Hsf1p durch Phosphorylierung ist wahrscheinlich. Die wichtigsten physiologischen Effekte bei Hitzeschock sind ein Anhalten des Zellzyklus (Trotter *et al.* 2001), die Expression von Hitzeschockproteinen und die Akkumulation von Trehalose. Die Hsp70-Hitzeschockproteine (vor allem die *SSA*-Unterfamilie) spielen bei der Regulation der Hsf1p-vermittelten Transkriptionskontrolle eine wichtige Rolle, sind aber als Chaperone auch an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt. Mitglieder der *SSA*-Familie besitzen eine ATPase-Aktivität, die durch Bindung von Peptiden stimuliert wird. Das Hitzeschockprotein Hsp104 ist dagegen an der Auflösung von Proteinagglomeraten beteiligt.

Trehalose ist als kosmotrope Substanz in der Lage, makromolekulare Strukturen und Membranen zu stabilisieren (Hottiger *et al.* 1994, Singer und Lindquist 1998, Tsvetkova 1998, Sola-Penna und Meyer-Fernandes 1998, Simola *et al.* 2000). Trehalose wird aus UDP-Glucose durch einen Multienzymkomplex (TPS-Komplex, Bell *et al.* 1998) synthetisiert. Der

Abbau erfolgt cytoplasmatisch zu Glucose durch die neutrale Trehalase Nth1p. Eine weitere Trehalase mit saurem pH-Optimum, Ath1p, deren physiologische Bedeutung noch unklar ist, ist in der Vakuole lokalisiert. Eine Funktion der sauren Trehalase bei Wachstum auf Trehalose wurde gezeigt (Nwaka *et al.* 1996).

### **1.7.3 Osmotischer Streß**

In seiner natürlichen Umgebung ist *Saccharomyces cerevisiae* wechselnden osmotischen Bedingungen ausgesetzt. Da ein konstanter Zellturgor essentiell für das Wachstum der Zelle ist, müssen effektive Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Wasseraktivität vorhanden sein. Bei einem Regenschauer erfährt die Zelle, vor allem nach längerer Trockenheit, innerhalb von Sekunden einen hypoosmotischen Schock, so daß es zu einem raschen Einstrom von Wasser kommt. Neben ionischen Regulationsmechanismen ermöglicht der regulierte Glycerolfacilitator Fps1p unter diesen Bedingungen ein schnelles Ausströmen von Glycerol aus der Zelle (Luyten *et al.* 1995). Die Regulation der langfristigen Anpassung an hypoosmolare Bedingungen ist aber noch kaum verstanden (Hohmann 2002). Weit mehr ist über die Anpassung an hyperosmotische Bedingungen bekannt (Übersichtsartikel Estruch 2000, Blomberg 2000, Hohmann 2002). Die Transmembranproteine Sho1p und Sln1p generieren abhängig von der Osmolarität in der Umgebung der Zelle ein Signal, wobei der physikalisch wahrgenommene Reiz noch nicht bekannt ist. Eine Analyse der Osmosensitivität verschiedener Sln1p-Mutanten zeigte, daß die Region um zwei vorhergesagte Transmembrandomänen essentiell ist, um die Histidinkinaseaktivität des Proteins osmotisch regulierbar zu machen. Daher wird für Sln1p, im Gegensatz zu Sho1p, eine Funktion als Osmosensor angenommen. Neben Veränderungen der Plasmamembran (z.B. Membranspannung und -krümmung) wird auch die Beteiligung des Aktincytoskellets an der Reizwahrnehmung diskutiert (Hohmann 2002). Die beiden Membranproteine Sho1p und Sln1p stehen am Anfang einer MAP-Kinasekaskade, die „*high osmolarity glycerol pathway*“ (HOG-Weg) genannt wird; diese wird durch die MAP-Kinase Hog1p vermittelt, die innerhalb kurzer Zeit nach Aktivierung im Zellkern konzentriert wird. Der Sensor Sln1p ist unter hypoosmolaren Bedingungen aktiv und wird bei Anstieg der Osmolarität inaktiviert. Hog1p kann die biologische Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, zu denen auch die STRE-bindenden Msn2p und Msn4p gehören, durch Phosphorylierung steuern. Eine rasche Deaktivierung des Signals erfolgt wahrscheinlich durch eine transkriptionelle Aktivierung der Hog1p-dephosphorylierenden Phosphatasen Ptp2p und Ptp3p und durch ein Nachlassen der Sln1p-Aktivierung durch Adaptationserscheinungen (Turgorverminderung).

Nach einem hyperosmotischen Schock ändert sich die Expression von etwa 10 % aller Gene in *Saccharomyces cerevisiae* mehr als dreifach (Rep *et al.* 2000, Posas *et al.* 2000). Der wichtigste Adaptationsmechanismus unter diesen Bedingungen ist die Synthese von Glycerol als kompatibles Solut. Glycerol akkumuliert in der Zelle in sehr hoher Konzentration, ohne den Zellstoffwechsel zu stören und erniedrigt somit die Wasseraktivität im Cytoplasma (Reed *et al.* 1987). Neben den Genen für die Glycerolbiosynthese werden Gene des Aminosäure- und Lipidmetabolismus, sowie verschiedener Permeasen und weiterer unverwandter Proteine reguliert. In *Zygosaccharomyces rouxii* wurde dementsprechend ein erhöhter Sterolgehalt bei hyperosmotischem Streß gefunden (Rep *et al.* 2000). Trotz einer Regulation der Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p durch den HOG-Weg akkumulieren Trehalose und Glykogen nicht unter hyperosmolaren Bedingungen (Reed *et al.* 1987, Hounsa *et al.* 1998). Die Expression der Gene für Trehalosesynthese und -abbau wird aber unter diesen Bedingungen stark induziert (Rep *et al.* 2000). Blomberg (2000) geht von einem ATP-verbrauchenden Umsatz von Glycerol und Trehalose als „Sicherheitsventil“ aus: Ein hyperosmolarer Schock führt durch Verlust des Zellurgors zu einem schnellen Erliegen des Wachstums und der Synthese von Makromolekülen. Da die Glykolyse wahrscheinlich weiterlaufen kann, häufen sich energiereiche Zwischenstufen an, die den Fluß durch die Glykolyse noch erhöhen. Eine Anhäufung dieser Zwischenstufen könnte zum Zelltod durch Verarmung der Phosphatspeicher führen. Ein energieverbrauchender Umsatz von Glycerol (aus Dihydroxyacetonphosphat) und Trehalose (aus Glucose-6-Phosphat) könnte dieses Szenario verhindern.

Ein weiterer Hauptanpassungsmechanismus an wechselnde osmotische Bedingungen ist der Transport von Ionen (Serrano *et al.* 1999). Deletionsmutanten verschiedener Transportmoleküle für Ionen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegen hyperosmolaren Streß (Serrano *et al.* 1999, Hohmann 2002). Vor allem der endosomale  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter Nhx1p spielt wahrscheinlich bei erhöhter extrazellulärer Natriumkonzentration eine Rolle bei der Akkumulation von Natrium in der Vakuole (Nass und Rao 1999).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Primäres Ziel der Arbeit war die Identifizierung von Aminosäuretransportproteinen in der vakuolären Membran von *Saccharomyces cerevisiae*. Zu Beginn dieser Arbeit war der Transport verschiedener Aminosäuren in das vakuoläre Lumen durch kinetische Studien an intakten vakuolären Vesikeln biochemisch charakterisiert (Sato *et al.* 1984a/ b). Auch die *in vivo*-Akkumulation von Aminosäuren in der Vakuole in Abhängigkeit verschiedener

Stickstoffquellen war beschrieben (Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988). Trotz der kompletten Sequenzierung des Genoms 1996 war noch kein für einen vakuolären Aminosäuretransporter codierendes Gen bekannt. Durch *in silico*-Studien konnten ORFs identifiziert werden, die große Ähnlichkeit zu bekannten Transportproteinen aufweisen (André 1995, Paulsen *et al.* 1998). Dadurch konnten Gene für mögliche Aminosäuretransporter identifiziert werden, die innerhalb einer Kooperation einzeln und kombiniert im Wildtyphintergrund 23344c deletiert wurden. Die Deletionsmutanten standen für diese Arbeit zur Verfügung. Um diese Deletionsmutanten physiologisch zu charakterisieren, sollte durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran die Aminosäureverteilung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt werden; dadurch könnte ein eventueller Transportdefekt erkannt werden. Innerhalb der Kooperation sollten so gefundene putative Aminosäuretransporter biochemisch weiter untersucht werden. 1988 beschrieben Ohsumi *et al.* eine Methode zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* mittels Kupferchlorid. Der Wirkmechanismus des Kupfers ist aber nicht bekannt. Avery *et al.* (1996) beschrieben die Abhängigkeit der Kupfertoxizität vom Grad der Sättigung der Fettsäuren in der Plasmamembran. Keenan und Weiss (1997) konnten eine Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran durch Kupfer in *Neurospora crassa* zeigen. Dagegen ist die Wirkung von Nystatin auf Biomembranen gut untersucht. Nystatin bildet mit Ergosterol in den Zielmembranen sehr spezifisch Porenkomplexe, die die Diffusion von Kleinmolekülen über die Membran ermöglichen (Übersichtsartikel Bolard 1986). In *Saccharomyces cerevisiae* ist nur in der Plasmamembran ein hoher Ergosterolgehalt vorhanden, vor allem die vakuoläre und die innere mitochondriale Membran enthalten Ergosterol nur in sehr geringer Konzentration (Zinser *et al.* 1991, Schneiter *et al.* 1998). Da die Zusammensetzung der zellulären Membranen stark von den physiologischen Bedingungen abhängt, der Ergosterolgehalt aber wahrscheinlich außer unter anaeroben Bedingungen relativ konstant ist (Daum *et al.* 1998), sollte zur Charakterisierung der Deletionsstämme eine neue Routinemethode zur selektiven Metabolitextraktion mittels Nystatin entwickelt werden. Neben der Charakterisierung der Deletionsstämme sollte die neue Methode auf ihre Anwendbarkeit unter verschiedenen physiologischen Bedingungen und zur selektiven Extraktion unterschiedlicher Metabolite getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Hefestämme, Nährmedien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Rekombinante Stämme wurden in Kooperationsprojekten, innerhalb derer auch diese Arbeit erstellt wurde, ausgehend von den Wildtypstämmen 23344c, W303-1A und CEN.PK113 konstruiert. Der Stamm 23344c, abgeleitet von dem häufig verwendeten Wildtyp  $\Sigma$ 1278b (Grenson *et al.* 1966, Bechet *et al.* 1970), trägt die *per1*-Mutation nicht, die beide im Genomprojekt sequenzierten Stämme sowie die meisten allgemein verwendeten Laborstämme insensitiver gegen Ammoniumrepression macht (Roberg *et al.* 1997, ter Schure *et al.* 1999). Eine weitere Besonderheit der  $\Sigma$ 1278b-Derivate sind zwei intakte Genloci für Aquaporine. In vielen Laborstämmen sind beide Genloci, in manchen nur das Gen AQP2 defekt. AQP1 codiert für ein Aquaporin in der Plasmamembran, das Genprodukt von AQP2 konnte bisher nicht funktional nachgewiesen werden (Laizé *et al.* 2000).

CEN.PK-Stämme wurden für die Untersuchung von Stoffflüssen konstruiert und sollten günstige physiologische Eigenschaften mit guter genetischer Zugänglichkeit vereinbaren (Entian und Koetter 1998). Diese Stammfamilie wurde neben dem Genomprojektstamm S288C in EUROFAN-Projekten als Referenzstamm verwendet (<http://mips.gsf.de/proj/eurofan/>).

Der Wildtypstamm W303-1A (Thomas und Rothstein 1989) ist ebenfalls als Laborstamm weit verbreitet und wurde als Vergleichsstamm zum Referenzstamm FY1679 (isogen zum sequenzierten Stamm S288A) im EUROFAN I-Projekt verwendet.

**Tabelle 1** In dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Referenz
<b>Wildtyphintergrund 23344c</b>		
23344c	MATa <i>ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 224	MATa <i>yel064c</i> $\Delta$ <i>ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 226	MATa <i>yer119c</i> $\Delta$ <i>ura3</i>	B. André, Universität Brüssel

**Tabelle 1** Fortsetzung

JA 228	<i>MATα yil088cΔ ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 230	<i>MATα yjr001wΔ ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 254	<i>MATα yil088cΔ yer119cΔ ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 293	<i>MATα yer119cΔ yil088cΔ yel064::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 295	<i>MATα yil088cΔ yer119cΔ yel064cΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 296	<i>MATα ynl101wΔ ykl146wΔ yjr001wΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 298	<i>MATα ykl146w Δ ynl101wΔ yjr001wΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 324	<i>MATα ynl065wΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
JA 328	<i>MATα ymr088cΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
RK 15	<i>MATα ygr138cΔ::KanMX ura3</i>	M. Albertsen, Universität Köln
RK 32	<i>MATα ath1Δ nth1Δ::KanMX ura3</i>	M. Albertsen, Universität Köln
WF 1	<i>MATα ycr023cΔ::lacZ ura3</i>	W. Frommer, Universität Tübingen
ME020	<i>MATα ymr088cΔ::KanMX ura3</i>	B. André, Universität Brüssel
<b>Wildtyphintergrund CEN.PK</b>		
K1 (CEN.PK113-5D)	<i>MATα ura3-52 MAL2-8c SUC2</i>	K.D. Entian, Frankfurt
K26 (CEN.PK113-13D)	<i>MATα ura3-52 MAL2-8c SUC2</i>	K.D. Entian, Frankfurt

**Tabelle 1** Fortsetzung

**Wildtyphintergrund W303**

W303-1A	MATa <i>leu2-3/112 ura3-1 trp161 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal0</i>	de Jesus Ferreira <i>et al.</i> (2001)
W303-p	MATa <i>can1-100 GAL SUC2 mal0</i>	de Jesus Ferreira <i>et al.</i> (2001)
W303-1A-126	MATa <i>leu2-3/112 ura3-1 trp161 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal0 ymr126cΔ::KanMX4</i>	de Jesus Ferreira <i>et al.</i> (2001)
W303-p-126	MATa <i>can1-100 GAL SUC2 mal0 ymr126cΔ::KanMX4</i>	de Jesus Ferreira <i>et al.</i> (2001)

**2.1.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen**

Für die Experimente in Schüttelkultur wurde definiertes CBS *modified*-Medium nach Verduyn *et al.* (1992) verwendet (siehe 6.1). Dieses Medium wurde mit 50 mg/l Uracil supplementiert. Es wurden verschiedene Variationen bezüglich der Stickstoffquelle und des Puffers verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde die im Anhang beschriebene Standardzusammensetzung verwendet. Mit Bernsteinsäure gepuffertes Medium wird in dieser Arbeit als CBSS bezeichnet, mit Kaliumphthalat gepuffertes Medium mit CBSKP. Weiterhin wurde käufliches Minimalmedium (YNB, Difco Laboratories, Detroit, USA) für einige Experimente verwendet. Für die mikroskopischen Experimente wurden Zellen in YM-Medium (ATCC-Medium 200, <http://www.atcc.org/>) angezogen, Stammplatten wurden mit YPD Medium (Sherman *et al.* 1986) mit 2 % Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) gegossen und aus Glycerolstammkulturen 48 h bei 30 °C inokuliert.

Für Glycerolstammkulturen wurden die Zellen auf YPD-Medium angezogen und in 15 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert.

**YNB-Medium:** 6,7 g/l YNB (Difco Laboratories, Detroit, USA)  
20 g/l Glucose  
0,5 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 mg/l Uracil

<b>YM-Medium:</b>	3 g/ l Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	3 g/ l Malzextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	5 g/ l Pepton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
	10 g/ l Glucose
<b>YPD-Medium:</b>	10 g/ l Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	20 g/ l Pepton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
	20 g/ l Glucose

Vorkulturen wurden frisch von Stammplatten angeimpft und bis zu einer Zelldichte von mindestens  $OD_{600} = 6,5$  bei 30 °C in Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen bei 130 Upm geschüttelt. Ein Aliquot dieser Vorkulturen wurde in frischem Medium über Nacht bei 30 °C und 110-130 Upm in Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen bis zur gewünschten Zelldichte geschüttelt. Für *shift*-Experimente wurde diese Kultur durch Zentrifugation bei 3000 g/ 4 °C steril geerntet, zweimal mit autoklaviertem, eiskaltem deionisiertem Wasser gewaschen und in frischem Medium resuspendiert.

### **2.1.2 Chemikalien**

Alle Chemikalien, wenn nicht gesondert aufgeführt, entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D; Merck AG Darmstadt, D und Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe, D bezogen. Alle verwendeten Lösemittel waren „HPLC grade“ und wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen; D; Baker, Deventer NL und Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe, D bezogen.

### **2.2 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)**

Die Zelltrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt. Ein Zellaliquot wurde über gewogene Glasfaserfilter Typ F (Millipore, Eschborn, D) filtriert, mit 10-30 ml Reinstwasser gewaschen und über Nacht bei 70 °C getrocknet. Nach erneutem Wiegen der Filter konnte die Biotrockenmasse berechnet werden.

## **2.3 Bestimmung der Vitalität**

### **2.3.1 Bestimmung der colonie forming units (CFU)**

Die Zellen wurden aus der Kultur mit sterilem Wasser auf eine Zelldichte von etwa  $10^4$  Zellen/ml verdünnt und mindestens 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf YPD-Agar ausplattiert. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

### **2.3.2 Vitalfärbung nach Sivadon et al. (1997)**

Dieser Test beruht auf der Fähigkeit intakter Zellen, den in die Zelle diffundierenden Farbstoff Methyleneblau aktiv ins Medium zu sezernieren. 100  $\mu$ l Zellkultur wurden durch Zentrifugation (3 min/ 3200 g) pelletiert, in 200  $\mu$ l 2 % (w/v) Trinatriumcitrat/ 0,01 % Methyleneblau resuspendiert und 10 min bei 30 °C geschüttelt. Blau gefärbte Zellen konnten als metabolisch defekt durch Auszählen in einer Zählkammer nach Thoma (Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, D) quantifiziert werden.

## **2.4 Selektive Extraktion cytosolischer Metabolite**

### **2.4.1 CuCl<sub>2</sub>-Methode nach Ohsumi et al. (1988)**

Zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran wurde unter anderem die Standardmethode nach Ohsumi *et al.* (1988) verwendet. Zellkulturen wurden durch Filtration über Glasfaserfilter Typ F (Millipore, Eschborn, D) geerntet, mit eiskaltem Reinstwasser gewaschen und bei einer OD<sub>600</sub> von 10-12 in Permeabilisierungspuffer resuspendiert. 990  $\mu$ l dieser Suspension wurden nach Zugabe von 10  $\mu$ l 20 mM CuCl<sub>2</sub> 10 min bei 30 °C inkubiert, über Glasfaserfilter (Millipore) filtriert und zweimal mit 500  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden als cytosolischer Extrakt verwendet. Die zellulären Rückstände wurden in Reinstwasser resuspendiert und 15 min bei 100 °C inkubiert, filtriert und mit 500  $\mu$ l Reinstwasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden als vakuolärer Extrakt verwendet. Ein Milliliter der Zellsuspension wurden mit etwa 750  $\mu$ l Schüttvolumen säuregewaschener Glasperlen (425-600 microns, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) 15 min im Laborhomogenisator MSK (B. Braun AG, Melsungen, D) aufgeschlossen und der klare Überstand nach Zentrifugation (10 min/ 25800 g) als Gesamtextrakt verwendet.

Alle Experimente wurden dreifach bestimmt aus parallelen Kulturen durchgeführt.

**Permeabilisierungspuffer:** 5 mM Kaliumphosphat pH 5,0  
0,6 M Sorbit  
10 mM Glucose

#### ***2.4.2 Selektive Permeabilisierung mit Nystatin***

Zellkulturen wurden durch Filtration über Glasfaserfilter Typ F (Millipore, Eschborn, D) geerntet, mit eiskaltem Permeabilisierungspuffer gewaschen und bei einer OD<sub>600</sub> von 3,0 in eiskaltem Permeabilisierungspuffer resuspendiert. 980 µl dieser Suspension wurden mit 20 µl 0,1 % Nystatin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) in DMSO versetzt, 15 min bei 30 °C und 1400 Upm Schüttelheizblock (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert und bei 3200 g/ 4 °C/ 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde sofort mit 500 µl eiskaltem Permeabilisierungspuffer gewaschen und die vereinigten Überstände als cytosolischer Extrakt verwendet. Die Pellets sowie ein 1 ml-Aliquot der Originalsuspension wurden mit 750 µl Schüttvolumen säuregewaschener Glasperlen (425-600 microns, Sigma Taufkirchen) in 1 ml Reinstwasser 15 min im Laborhomogenisator MSK (B. Braun AG Melsungen, D) aufgeschlossen und der klare Überstand nach Zentrifugation (10 min/ 25800 g) als vakuolärer Extrakt bzw. Gesamtextrakt verwendet. Optional wurden Gesamtextrakte durch 10 min Inkubation mit 5 % (w/ v) Trichloressigsäure bei Raumtemperatur hergestellt.

Alle Experimente wurden dreifach bestimmt aus parallelen Kulturen durchgeführt.

**Permeabilisierungspuffer:** 10 mM PIPES, pH 6,8 mit NaOH eingestellt.  
Optional (nur wenn angegeben): 0,6 M Sorbit

#### ***2.4.3 Cytochrom c-Methode nach Dubois und Wiame (1978)***

Diese Methode beruht auf der selektiv permeabilisierenden Wirkung niedriger Konzentrationen makromolekularer Polybasen auf die Hefepiasmamembran (Wiemken und Nurse 1973, Dürr *et al.* 1975). Zellkulturen wurden durch Filtration über Glasfaserfilter Typ F (Millipore, Eschborn, D) geerntet, mit eiskaltem Reinstwasser gewaschen und bei einer Zelldichte von 5 g/ l in eiskaltem Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Es wurde 1 mg/ ml Cytochrom c (salzfrei, Roche Diagnostics, Mannheim, D) zugegeben und der Ansatz 60 min auf Eis geschüttelt. Nach Filtration und zweimaligem Waschen mit eiskaltem Permeabilisierungspuffer wurden die vereinigten Filtrate als cytosolischer Extrakt verwendet, der Zellrückstand wurde in 5 ml Reinstwasser resuspendiert und nach Zugabe von TCA (Endkonzentration 5 % (w/ v)) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, nach Zentrifugation

(25800 g/ 5 min/ 4 °C) mit 500 µl Reinstwasser gewaschen und die vereinigten Überstände als vakuolärer Extrakt verwendet.

**Permeabilisierungspuffer:** 0,05 M Natriumacetat pH 4,8 mit NaOH  
1,0 M Sorbit

## **2.5 Schnelle Probennahme**

Um eine schnelle Inaktivierung des zellulären Metabolismus zu erreichen und somit *in vivo* die Konzentration von Metaboliten bestimmen zu können, wurde eine schnelle Probennahme nach Gonzalez *et al.* (1997) modifiziert. Ein Kulturaliquot (2 ml) wurde über Glasfaserfilter schnell abfiltriert und, um die bei der GC-Analyse störende Glucose zu entfernen, mit eiskaltem Wasser gewaschen. Die Filter wurden sofort in 5 ml 80 °C heißen Extraktionspuffer (+ 150 µl 1 mM myo-Inosit/ 1 mM Saccharose) überführt. Nach 5-10 min Inkubation bei 80 °C, während denen mehrmals gut gemischt wurde, wurden die Extrakte abgekühlt und anschließend bei 60 mbar und 50-60 °C im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 2 ml Reinstwasser aufgenommen und auf etwa 150 µl in einer Vakuumzentrifuge (Univapo UVC 150H, Savant Instruments, Holbrook, USA) eingengt. Die Proben wurden weitere 50 h im Kühltopf eines Lyophilisators (Lyovac GT2, Leybold Vakuum, Köln, D) getrocknet, Restfeuchtigkeit durch azeotropes Verschleppen mit Toluol bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom entfernt und die Proben über Nacht im Exsikkator über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet und zur GC-Analyse derivatisiert. Die derivatisierten Proben wurden durch Zugabe von je 200 µl CaCl<sub>2</sub>-getrocknetem und destilliertem Dichlormethan vollständig gelöst und 1,5 µl zur Analyse eingesetzt.

**Extraktionspuffer:** 0,1 M HEPES pH 7,5 mit NaOH  
90 % (v/v) Ethanol

## **2.6 Isolierung intakter Vakuolen nach Wiemken und Dürr (1974)**

Zellkulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch 5-minütige Zentrifugation bei 4000 g/ 4 °C geerntet, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und bei einer OD<sub>600</sub> von 8-10 in Präshäroplastierungslösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei 120 Upm/ 30 °C wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation geerntet, einmal mit SOB gewaschen, bei einer OD<sub>600</sub> von 8-10 in SOB resuspendiert und etwa 30 mg *lysing enzymes* (aus *Trichoderma harzianum*, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) zugegeben. Die Zellen wurden bei 30 °C/ 120 Upm geschüttelt, bis etwa 90-95 % aller Zellen sphäroplastiert waren (mikroskopische Kontrolle). Die Sphäroplasten wurden 5 min bei 3000 g/ 4 °C

abzentrifugiert, vorsichtig mit SOB gewaschen und polybaseninduziert lysiert (Dürr *et al.* 1975). Dazu wurden die Zellen bei einer  $OD_{600}$  von 12-15 in kaltem SOB resuspendiert und mit 10 bis 200  $\mu\text{g/ml}$  DEAE-Dextran 400000 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) fünf Minuten inkubiert. Die genaue Dosis wurde für jede Zellcharge unter mikroskopischer Kontrolle an einem Aliquot ausgetestet. Die Vakuolen wurden mit den Zelltrümmern 20 min bei 3500  $\text{g}/4\text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und in 5 ml/ 100 ml Kultur mittels aspirieren in eine 5 ml-Pipettenspitze in SOB resuspendiert. Diese Rohpräparation wurde über einen isoosmotischen Dichtegradienten fraktioniert (siehe Abbildung 4). Nach einer Stunde Zentrifugation bei 69000  $\text{g}/4\text{ }^\circ\text{C}$  im Sw41Ti-Ausschwingrotor (Beckmann-Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof, D) wurde der Gradient manuell fraktioniert. Das Pellet wurde in 1 ml Reinstwasser resuspendiert. Alle Fraktionen wurden 2 bis 4-fach mit Reinstwasser verdünnt 15 Minuten bei 100  $^\circ\text{C}$  inkubiert, um alle Metabolite freizusetzen. Nach 10 min Zentrifugation bei 24000  $\text{g}/4\text{ }^\circ\text{C}$  wurden die klaren Überstände zur Metabolitanalyse eingesetzt. Die Aliquots für die Gaschromatographie wurden 48 h im Kühltopf eine Lyophilisators vorgetrocknet, dann mehrfach mit Toluol bei 50  $^\circ\text{C}$  im Stickstoffstrom azeotrop verschleppt und über Nacht im Exsikkator bei Vakuum über  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  getrocknet und anschließend derivatisiert.

**Präsphäroplastierungslösung:** 0,1 M Tris, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

0,6 M Sorbit

5 mM EDTA

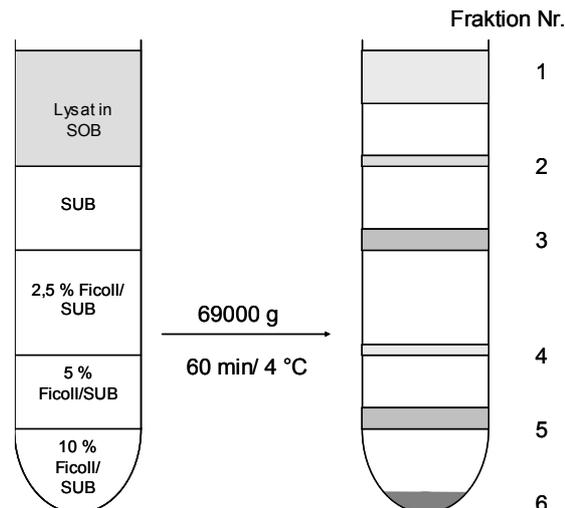
5 mM DTE frisch zugesetzt

**SOB:** 10 mM PIPES, mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt

0,6 M Sorbit

**SUB** 10 mM PIPES, mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt

0,6 M Saccharose



**Abbildung 4** Schematische Darstellung des isoosmotischen Dichtegradienten zur Isolierung intakter Vakuolen vor und nach der Zentrifugation. Im rechten Teil ist die optisch sichtbare Fraktionierung der Zellen dargestellt. Von jeder Fraktion wurde 1 ml abpipetiert.

## 2.7 Metabolitanalyse

### 2.7.1 HPLC-Analyse von Aminosäuren

Es wurden mehrere Routineverfahren zur Aminosäuretrennung mittels *reversed phase* Chromatographie verglichen. Alle Trennungen wurden auf einem HP 1090 M- (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, D) und einem HP 1100-System (Agilent Technologies, Waldbronn, D), ausgestattet mit den Fluoreszenzdetektoren HP 1046 bzw. HP 1100 *series*, an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm Trennsäulen mit 40 x 4,6 mm Vorsäulen (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, D) bei 40 °C durchgeführt. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mittels der HP Chemstation software v 6.03 (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, D).

#### 2.7.1.1 OPA-Mercaptoethanol-Derivatisierung

Primäre Aminosäuren wurden durch automatische Präsäulenderivatisierung (Tabelle 2, Schritt 1-7/ 11/ 12) in fluoreszierende 2-mercaptoethanolsubstituierte Isoindole überführt (Lindroth und Mopper 1979). Die Trennung erfolgte mit dem in Tabelle 3 beschriebenen Gradientenprogramm (Laufmittel A: 0,1 M Natriumacetat pH 7,2, Laufmittel B: Methanol). Die quantitative Auswertung erfolgte durch externe Standardisierung, Kontrollen wurden durch Aufstocken von Zellextrakten mit Aminosäurestandards durchgeführt.

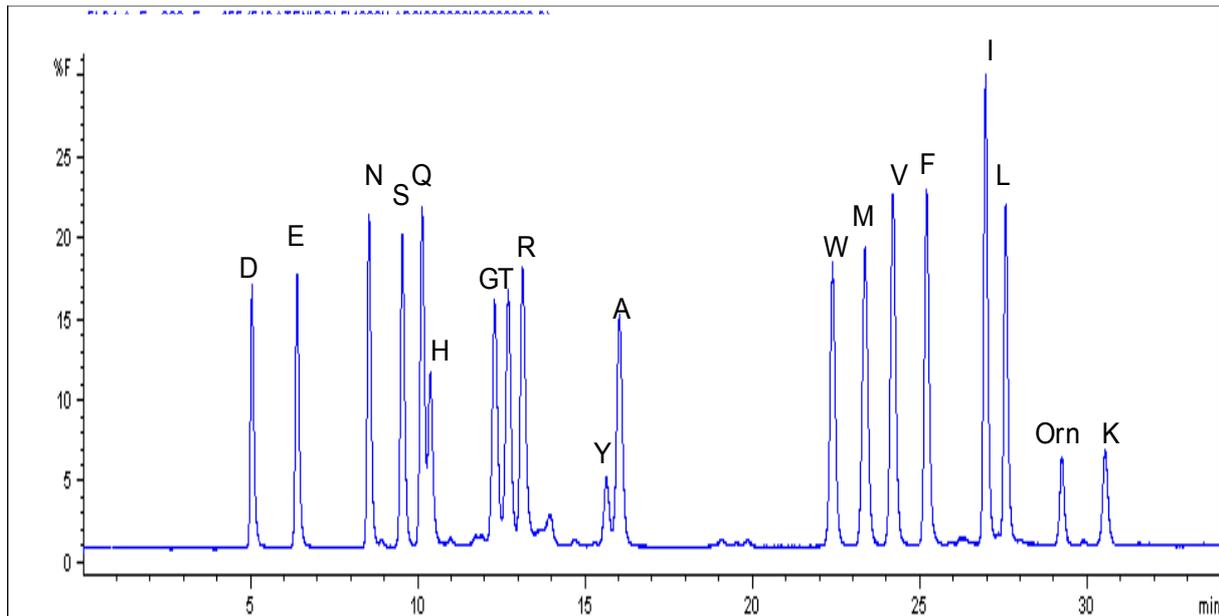
**OPA-Reagenz:** 0,08 % (w/ v) OPA  
 0,2 % (v/ v) 2-Mercaptoethanol bzw. 3-Mercaptopropionsäure  
 2,5 % Kaliumborat pH 10,4  
 0,003 % (w/ v) Brij® 35

**Tabelle 2** Programm des automatischen Probengebers für die Präsäulenderivatisierung mit OPA-Mercaptoethanol bzw. OPA-Mercaptopropionsäure/ Fmoc-Cl. Modifiziert nach Schuster (1988). Die Schritte 8 bis 10 entfielen bei OPA-Mercaptoethanolderivatisierung.

Schritt	Volumen [ $\mu$ l]	Lösung	Zeit [min]/ Aktion
1 Aufziehen	4,5	OPA-Reagenz	-
2 Aufziehen	1-2	Probe	-
3 Aufziehen	0	Wasser	-
4 Aufziehen	4,5	OPA-Reagenz	-
5 Mischen	10-11	-	1 Zyklus
6 Warten	-	-	1
7 Aufziehen	0	Wasser	-
8 Aufziehen	1	Fmoc-Cl	-
9 Mischen	11-12	-	2 Zyklen
10 Warten	-	-	1
11 Injektion/ Injektor <i>mainpass</i>	-	-	1,5
12 Injektor <i>stand by</i>	-	-	-

**Tabelle 3** Pumpen- und Detektorprogramm für die Trennung von OPA-Mercaptoethanol-derivatisierten primären Aminosäuren.

Zeit [min]	Laufmittel B [% (v/ v)]	Flussrate [ml/ min]	Anregungs-/ Detektionswellenlänge [nm]
0	25	0,5	230/ 455
7	30	0,5	230/ 455
20	50	0,5	230/ 455
25	65	0,5	230/ 455
35	Ende	0,5	-



**Abbildung 5** Chromatogramm der Trennung von 1 µl eines OPA-Mercaptoethanol-derivatisierten Aminosäure-Standardgemischs (je 100 µM, Tyrosin 20 µM), an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm.

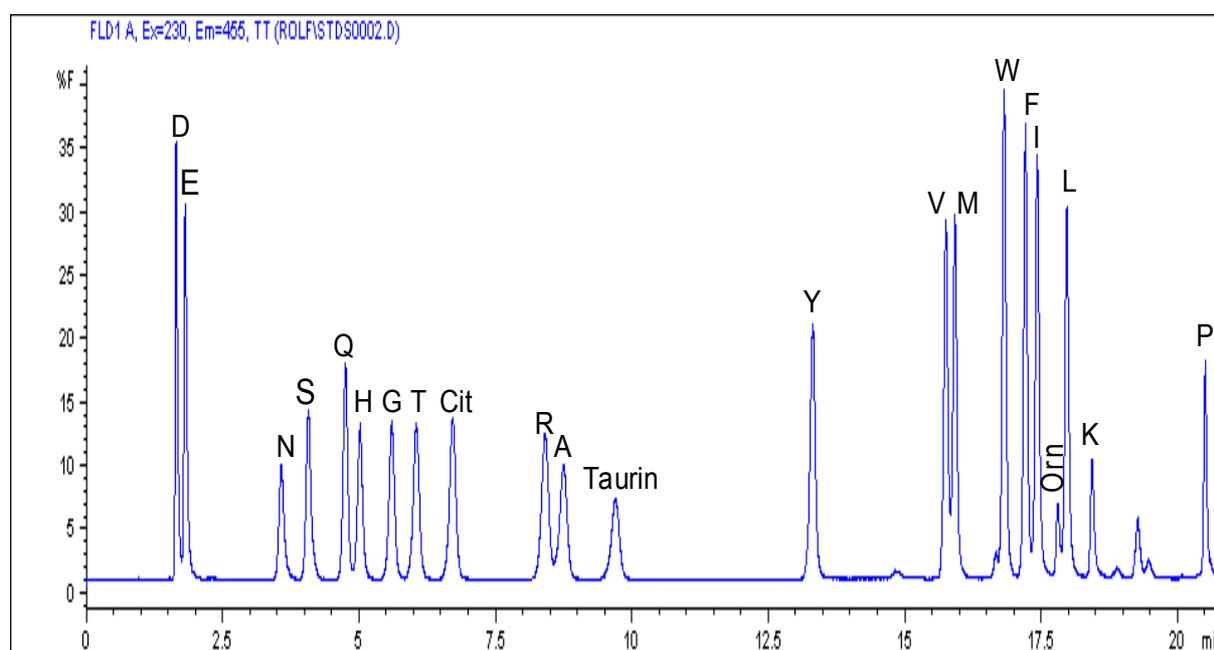
### 2.7.1.2 OPA-Mercaptopropionsäure/ FmocCl-Derivatisierung

Primäre Aminosäuren wurden durch automatische Prässäulenderivatisierung (Tabelle 2) in fluoreszierende mercaptopropionsäuresubstituierte Isoindole überführt, sekundäre Amine wurden in die substituierten Carbamate (Schuster 1988) überführt. Diese Methode erlaubte die Quantifizierung von Prolin und brachte eine höhere Selektivität bei kürzeren Trennzeiten sowie eine bessere *batch*-Reproduzierbarkeit mit wiederbefüllten Säulen. Die Trennung erfolgte mit dem in Tabelle 4 beschriebenen Gradientenprogramm (modifiziert nach Gratzfeld-Huesgen 1999) mit Laufmittel A: 0,02 M Natriumacetat + 0,018 % (v/v) TEA pH 7,2/ 0,3 % (v/v) THF und Laufmittel B: Acetonitril/ Methanol/ 0,1 M Natriumacetat pH 7,2 = 2/ 2/ 1 (v/v/v). Dieses Phasensystem wurde verwendet, da eine höhere Selektivität im Vergleich zur Originalmethode nach Schuster (1988) erreicht wurde. Außerdem konnte eine Mindestkonzentration von 5 % organischer Phase im Gradienten gewährleistet werden, was die Reproduzierbarkeit der Läufe deutlich erhöhte. Die quantitative Auswertung erfolgte durch externe Standardisierung, Kontrollen wurden durch Aufstocken von Zellextrakten durchgeführt. Alle Proben wurden zur Kontrolle intern mit Taurin standardisiert

**Fmoc-Cl-Reagenz** 0,01 % (w/v) Fmoc-Cl (Fluka, Neu-Ulm, D) in Acetonitril

**Tabelle 4** Pumpen- und Detektorprogramm für die Trennung von OPA-Mercaptopropionsäure und Fmoc-Cl-derivatisierten Aminosäuren.

Zeit [min]	Laufmittel B [% (v/ v)]	Flussrate [ml/ min]	Anregungs-/ Detektionswellenlänge [nm]
0	7	0,8	230/ 455
3	10	0,8	230/ 455
3,1	10	1,0	230/ 455
10,2	15	1,0	230/ 455
18,2	50	1,0	230/ 455
20	100	1,0	266/ 310
23	Ende	1,0	-



**Abbildung 6** Chromatogramm der Trennung von 1 µl eines OPA-Mercaptopropionsäure/ Fmoc-Cl-derivatisierten Aminosäure-Standardgemischs (je 100 µM, Taurin 50 µM) an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm.

### 2.7.2 HPLC-Analyse von Polyaminen

Die Quantifizierung von Polyaminen erfolgte modifiziert nach Price *et al.* (1992) nach Überführung in fluoreszierende Dansylderivate. Dazu wurden 400 µl der Zellextrakte mit 40 µl 100 µM Cadaverin intern standardisiert, mit 600 µl 20 % (w/ v) Natriumcarbonat alkalisiert und der Ansatz mit 500 µl 20 mg/ ml Dansylchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) in Aceton 30 min bei 60 °C im Dunkeln derivatisiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl 50 mg/ ml L-Prolin gestoppt und überschüssiges Aceton 30 min bei 60 °C im Dunkeln abgedampft. Die dansylierten Polyamine wurden in 500 µl Toluol extrahiert, bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und in 20-50 µl Methanol gelöst zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Die Trennung erfolgte an Hypersil ODS 5 (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, D) 125 x 4,6 mm-Trennsäulen mit 40 x 4,6 mm Vorsäulen auf einem HP 1100 HPLC-System mit Fluoreszenzdetektor der 1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, D). Es wurde ein Stufengradient (Tabelle 5) mit Laufmittel A: Reinstwasser und Laufmittel B: Methanol (75-100 % (v/v)) bei einem Volumenfluß von 0,5 ml/min zur Trennung verwendet. Zur Fluoreszenzdetektion wurde eine Anregungswellenlänge von 340 nm und eine Detektionswellenlänge von 540 nm gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels der HP Chemstation v 6.03 software.

**Tabelle 5** Pumpenprogramm zur Trennung von dansylierten Polyaminen modifiziert nach Price *et al.* (1992).

Zeit [min]	Laufmittel B [% (v/v)]	Flussrate [ml/min]
0	75	0,5
7	80	0,5
8	95	0,5
10	100	0,5
14	Ende	-

### 2.7.3 HPLC-Analyse von Nukleotiden

#### 2.7.3.1 Isokratische Trennung

Diese Methode war durch die kurzen Laufzeiten sensitiver als die unter 2.7.3.2 beschriebene und lieferte auch ohne Anreicherung exakte Meßwerte. Der Nachteil lag in der mangelnden Selektivität, so daß eine Überbestimmung der Nukleotide nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Zellextrakte wurden isokratisch an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, D) mit 40 x 4,6 mm Vorsäule mit 80 mM Kaliumphosphat pH 5,0/ 5 mM TBAHS (Fluka, Neu-Ulm, D)/ 23 % (v/v) Methanol bei einer Flussrate von 0,8 ml/min aufgetrennt (modifiziert nach Litters und Schmelzeisen-Redeker (1989)). Die Detektion erfolgte mittels Photometrie bei 254 nm. Es wurde ein Beckmann Gold Nouveau HPLC-System (Beckmann-Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof, D) mit dem Pumpenmodul NM 126 und Diodenarraydetektor 168 verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der Beckmann Gold Nouveau software v 1.6.

#### 2.7.3.2 Trennung modifiziert nach Patthy *et al.* (1990)

Diese Trennung der Zellextrakte lieferte eine höhere Selektivität im Vergleich zur isokratischen Trennung. Um eine hinreichende Sensitivität zu erreichen wurden die gefrorenen Extrakte in der Vakuumzentrifuge (Univapo UVC 150H, Savant Instr., Holbrook,

USA) 10 bis 20-fach angereichert. Mit dieser Methode konnte neben Nukleotiden die Konzentration der Nystatinisomere in Zellpermeabilisaten ermittelt werden, die bei 305 nm photometrisch detektiert wurden und ein charakteristisches UV-Spektrum mit drei Maxima besaßen. Die Trennung erfolgte an einer 250 x 4 mm Lichrosorb 5 $\mu$  RP 18-Säule (Merck AG, Darmstadt, D) mit 40 x 4 mm Vorsäule mittels eines binären Gradienten (Laufmittel A: 15 mM Kaliumphosphat pH 5,0/ 10 mM TBAHS (Fluka, Neu-Ulm, D), Laufmittel B: 35 mM Kaliumphosphat pH 5,0/ 10 mM TBAHS/ 60 % (v/v) Acetonitril, Tabelle 6) mit dem in 2.7.3.1 beschriebenen HPLC-System bei einer Flussrate von 1,0 ml/ min. Die Auswertung erfolgte durch externe Standardisierung.

**Tabelle 6** Pumpenprogramm zur Trennung von Nukleotiden modifiziert nach Patthy *et al.* (1990).

<b>Zeit [min]</b>	<b>% Laufmittel B</b>	<b>Flussrate [ml/ min]</b>
0	5	1,0
3	5	1,0
13	45	1,0
20	55	1,0
23	100	1,0
25	Ende	-

#### **2.7.4 HPLC-Analyse von Bernsteinsäure**

Bernsteinsäure wurde im Kulturüberstand mittels isokratischer HPLC bestimmt. Dazu wurden 20  $\mu$ l der Proben an einer Multospher 120 RP 18-5 $\mu$  125 x 4,6 mm-Säule bei einer Flußrate von 1 ml/ min mit 2 % (v/v) Acetonitril/ 5 mM TBAHS (Fluka, Neu-Ulm, D) isokratisch aufgetrennt. Das verwendete HPLC-System wurde in 2.7.3.1 beschrieben, die Detektion erfolgte durch Photometrie bei 220 nm.

#### **2.7.5 GC-Analyse von Polyolen**

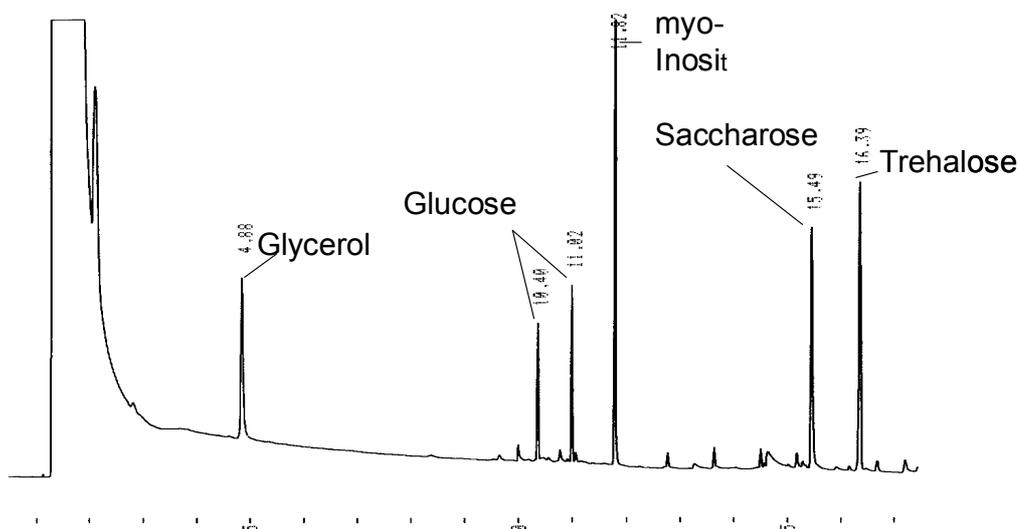
Trehalose und Glycerol wurden gaschromatographisch nach Trimethylsilylierung quantifiziert. 500  $\mu$ l der Zellextrakte wurden mit je 75  $\mu$ l 1 mM myo-Inosit und Saccharose intern standardisiert und durch Festphasenextraktion an ENVI 18 *reversed phase*-Säulchen (Supelco, Bellefonte, USA) extrahiert. Dazu wurden die Proben mit 500  $\mu$ l 1 mM HCl auf die mit 5 ml Methanol und anschließend mit 5 ml Reinstwasser vorbereiteten Säulchen aufgetragen und mit 1 ml Reinstwasser eluiert. Dieser Schritt war nur für sehr konzentrierte Rohextrakte notwendig. Die vereinigten Eluate wurden durch Lyophilisieren etwa 20-fach konzentriert, anschließend bei 60 °C im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und die Restfeuchtigkeit mit Toluol azeotrop verschleppt. Vor der Derivatisierung wurden die Proben

über Nacht im Exsikkator über  $P_4O_{10}$  getrocknet. Die trockenen Proben wurden mit 50  $\mu\text{l}$  wasserfreiem Pyridin 15 min im Ultraschallbad suspendiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  MSTFA/ TMCS (beide CS-Chromatographieservice, Langerwehe, D) 99/ 1 (v/ v) 60 min bei 100 °C umgesetzt.

Die Analyse erfolgte mit einem Fisons 9000 GC mit FID und Elektrometer EL 980 (Fisons Instr., Rodano, I) an einer 50 m FS-SE-54-CB-0.25-Säule (CS Chromatographieservice, Langerwehe, D). Als Trägergas wurde Wasserstoff bei 2 ml/ min (geeicht bei 140 °C) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Hitachi-Merck-Integrators D-2000. Es wurden je 1,5  $\mu\text{l}$  der derivatisierten Proben durch Split-Injektion (Splitverhältnis 1:10) bei einer Injektor-und Detektorblocktemperatur von 280 °C appliziert und mit dem in Tabelle 7 aufgeführten Temperaturprogramm getrennt. Für eine genauere Analyse von  $\text{TMS}_3$ -Glycerol konnte das Splitverhältnis auf 25:1 erhöht werden.

**Tabelle 7** Temperaturprogramm zur GC-Analyse TMS-derivatisierter Polyole aus Hefe.

Zeit [min]	Säulentemperatur [°C]	Gradient [°C/ min]
0	100	-
2	100	15
14	280	-
19	280	Kühlung 50



**Abbildung 7** Gaschromatogramm eines MSTFA/ TMCS-derivatisierten Standardgemischs bei einem Splitverhältnis von 1:10 an 50 m FS-SE-54-0.25.

## 2.8 Enzymatische Bestimmung von ATP

ATP wurde in den Zellextrakten oder in DMSO-extrahierten Zellpellets enzymatisch nach Schimz *et al.* (1981) bestimmt. Bei diesem Test wird die Chemolumineszenz bei der ATP-

abhängigen Oxidation des Luciferins durch das Enzym Luciferase quantifiziert. Die Pellets aus 2.4.2 wurden in 100 µl DMSO resuspendiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Suspension mit eiskaltem Meßpuffer auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Zentrifugation (5 min/ 5000 g/ 4 °C) wurde der klare Überstand zur ATP-Bestimmung eingesetzt. Dazu wurden 100 µl Probe in der Meßkammer (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Wildbad, D) vorgelegt, mit 100 µl Luciferin/ Luciferase-Rohextrakt (2 mg/ ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) versetzt und die Luminiszenz innerhalb von 20 s Reaktionszeit bestimmt.

**Meßpuffer:**        50 mM TRIS pH 7,4 mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
                          3,5 mM MgSO<sub>4</sub>  
                          2,5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
                          0,6 mM EDTA

## **2.9 Enzymatische Glucosebestimmung**

Die Glucosekonzentration in Kulturüberständen wurde mit dem Saccharose/ Glucosetest von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) bestimmt. Prinzip ist die ATP-abhängige Umsetzung von D-Glucose durch Hexokinase in Glucose-6-Phosphat, das durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase NADP<sup>+</sup>-abhängig oxidiert wird, wobei das photometrisch leicht zu bestimmende NADPH entsteht. 1-50 µg Glucose in 50 µl Reinstwasser (oder entsprechend verdünnte Kulturüberstände) wurden mit 500 µl Reaktionspuffer gemischt und anschließend 20 µl der Enzymsuspension zugegeben. Nach 15 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Glucose wurde anhand einer Eichreihe quantifiziert.

## **2.10 Phosphatbestimmung**

Phosphat wurde, um auch Polyphosphate zu erfassen, in Zellextrakten nach saurer Hydrolyse bestimmt. Dazu wurde eine Test nach Ohnishi *et al.* (1975) verwendet, bei dem Ammoniummolybdat und Phosphat in saurer Lösung zur Molybdophosphorsäure reagieren, die dann reduktiv im neutralen pH-Bereich zu Molybdänblau polymerisiert.

Die Zellextrakte wurden auf 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt und 10 min auf 100 °C erhitzt, um Polyphosphate zu hydrolysieren. Ein Teil Probe wurde mit 5 Teilen des frisch angesetzten Nachweisreagenz (Wasser/ Molybdatreagenz/ Reduktionsreagenz 1/ 2/ 3) gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde mit 1/ 10 Volumen Entwicklerreagenz neutralisiert

und nach 10 min die Extinktion bei 720 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Berechnung wurde eine Eichreihe von 0,01-1 mM Kaliumphosphat erstellt.

<b>Molybdatreagenz:</b>	4 % (w/ v) Ammoniummolybdat 0,016 M EDTA
<b>Reduktionsreagenz:</b>	0,172 M Hydroxylamin 0,001 M Polyvinylpyrrolidon 0,0875 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Entwicklerreagenz:</b>	6,47 M NaOH 0,05 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

### **2.11 Bestimmung von Kaliumionen**

Kalium wurde in Zellextrakten mittels Flammenphotometrie (ELEX 6361 Flammenphotometer, Eppendorf, Hamburg, D) bestimmt. Es wurden mit Reinstwasser 1:10 verdünnte Extrakte mit Propan als Brennergas vermessen.

### **2.12 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Überprüfung der Selektivität der Permeabilisierung mit Nystatin wurden Vakuolen und Cytoplasma mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und anschließend die Zellen selektiv permeabilisiert. Dazu wurden die Zellaliquots durch Zentrifugation (3000 g/ 5 min) geerntet und in YM-Medium/ 25 mM Natriumcitrat pH 4,0 (1/ 1 (v/ v)) unter Zusatz von 20 µM Acridinorange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) und 100 µM Arg-CMAC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) resuspendiert und 30 min bei 30 °C und 1000 Upm im Schüttelheizblock inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (Kontrolle) und mit 20 ng/ g BTM Nystatin permeabilisiert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am Forschungszentrum Jülich am Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre (ICG-6) an einem Nikon Eclipse 1000 Fluoreszenzmikroskop (Filterblöcke UV-2A und B2-A ) in Kooperation mit Dr. Ralf Wilhelm durchgeführt. Die Bildauswertung und -darstellung erfolgte mit der LuciaG software (Nikon Inc., Tokio, J).

### **2.13 Berechnung und statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, in Dreifachbestimmung aus parallelen Kulturen durchgeführt. Die Biotrockenmasse wurde mindestens doppelt bestimmt. Aus den Dreifachbestimmungen wurden unabhängig die Werte für die spezifische

Metabolitkonzentration pro Gramm BTM berechnet. Aus den extrahierten cytosolischen und vakuolären Anteilen wurde unabhängig pro Kultur der vakuoläre Anteil (%) berechnet.

Aus den drei Bestimmungen wurde die **Standardabweichung s** berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n(n-1)}}$$

n = Anzahl der Stichproben

x<sub>i</sub> = i-ter Messwert

Zum Vergleich unabhängiger Dreifachbestimmungen kann ein **Konfidenzintervall** für den wahren Mittelwert  $\mu$  aus dem arithmetischen Mittel  $\bar{x}$  bei normal verteilten Grundgesamtheiten (z-Wert aus Literatur: t/ z-Tabelle) berechnet werden:

$$\bar{x} \pm z \cdot s$$

z ist tabelliert und abhängig von der Anzahl der Freiheitsgrade FG (n-1):

FG	z
1	12,71
2	4,3
3	3,18
4	2,78
5	2,57

**Zahlenbeispiel:** Bei einer Bestimmung des vakuolären Argininpools ergibt sich ein arithmetischer Mittelwert von 150  $\mu\text{mol/g}$  BTM mit einer Standardabweichung s von 15  $\mu\text{mol/g}$  BTM;

FG bei Dreifachbestimmung = 2,  $\rightarrow z = 4,3$  (n=3)

FG bei Sechsfachbestimmung = 5  $\rightarrow z = 2,57$  (n=6):

$$85,5 \mu\text{mol/g BTM} \leq \mu \leq 214,5 \mu\text{mol/g BTM}; n=3$$

$$111,5 \mu\text{mol/g BTM} \leq \mu \leq 188,6 \mu\text{mol/g BTM}; n=6$$

Um das Konfidenzintervall für die wahren Aminosäurepools mit einer höheren Genauigkeit zu beschreiben, sind damit mehr Einzelmessungen notwendig:

Für die **Mindestanzahl n der Stichproben** zur Schätzung des Mittelwerts mit einer gewünschten Genauigkeit d ergibt sich

$$n = z^2 \cdot \frac{\sigma^2}{d^2}$$

s kann als Schätzung für  $\sigma$  eingesetzt werden,

z ist abhängig von den Freiheitsgraden FG tabelliert,

d = Genauigkeit, die angestrebt wird.

**Zahlenbeispiel:** Für eine Standardabweichung von 15  $\mu\text{mol/g}$  BTM und eine gewünschte Genauigkeit d von +/- 10  $\mu\text{mol/g}$  BTM bei einem Vertrauensbereich von 95 % ergibt sich:

$$n = 3,8416 \cdot \frac{225}{100} \approx 8,6.$$

Es ist also eine mehrfache Wiederholung eines Experiments nötig, um einen gefundenen Unterschied zweier Grundgesamtheiten zu bestätigen. Bei unabhängigen Experimenten kann aber der Standardfehler (se) für die Standardabweichung eingesetzt werden.

$$\text{se} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Vertrauensbereich [%]	z
95	1,96
99	2,58
99,9	3,29

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Selektive Permeabilisierung mit Nystatin**

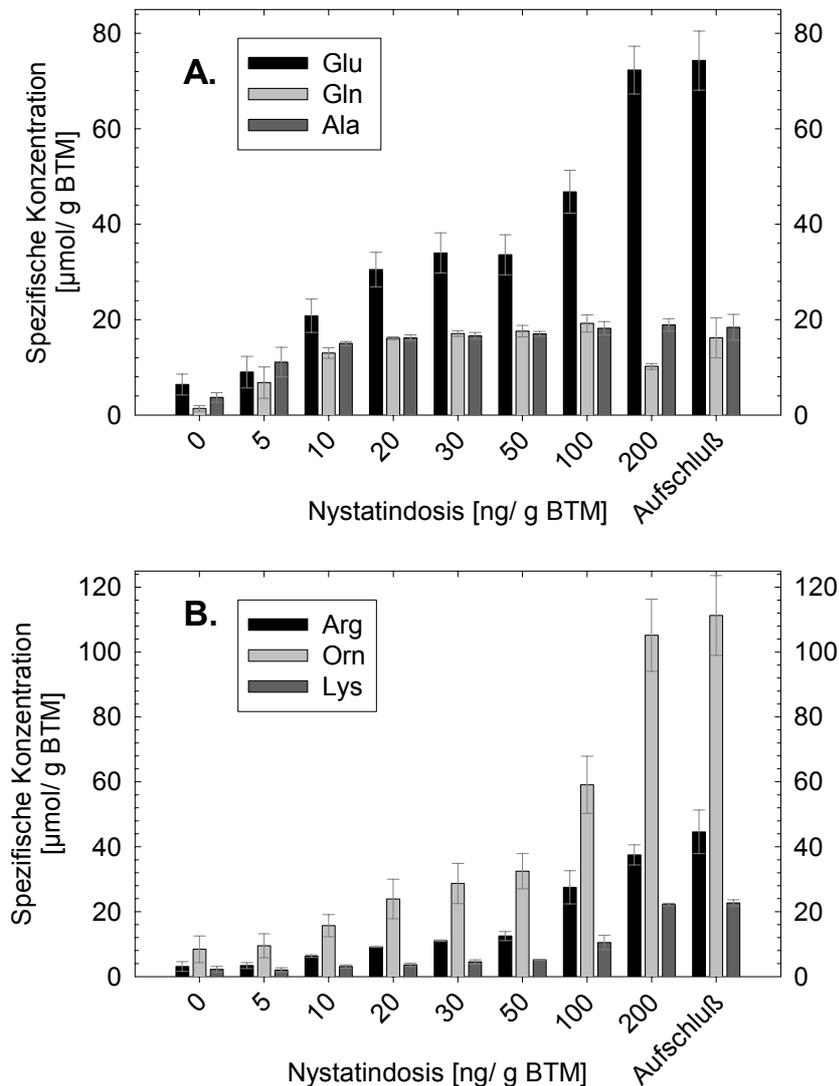
Ziel der Arbeit war zunächst die Etablierung einer Methode zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* mittels des Polyantibiotikums Nystatin, um den cytoplasmatischen Anteil verschiedener niedermolekularer Metabolite unter spezifischen Wachstumsbedingungen zu ermitteln. Nystatin bildet mit Ergosterol, der Hauptsterolkomponente der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* (Zinser *et al.* 1991, Daum *et al.* 1998), spezifische Porenkomplexe, die eine Diffusion niedermolekularer Moleküle über die Membran ermöglichen (Kitajima *et al.* 1976, Bolard 1986, Avéret *et al.* 1998, Larsson *et al.* 2000). Die Selektivität der Permeabilisierung beruht auf dem niedrigen Sterolgehalt interner Membranen (Zinser *et al.* 1990, Schneiter *et al.* 1999), so daß bei Behandlung der Zellen mit einer niedrigen Nystatindosis das Antibiotikum quantitativ an die Plasmamembran binden sollte. Der nicht cytoplasmatische Anteil der Zelle wird in dieser Arbeit als vakuolär bezeichnet, da die Vakuole, abhängig von den physiologischen Bedingungen, etwa 25 % des Gesamzellvolumens einnimmt und weitere intrazelluläre Kompartimente in erster Näherung zu vernachlässigen sind (siehe auch 3.4).

Um eine quantitative Freisetzung aller Metabolite durch Diffusion zu ermöglichen, wurde eine erhöhte Permeabilisierungstemperatur von 30 °C und eine niedrige Zelldichte im Inkubationspuffer (1 g/l) gewählt.

#### **3.1.1 Selektive Nystatindosis**

Die nötige Nystatindosis und Inkubationszeit zur selektiven Extraktion der cytoplasmatischen Metabolite wurde durch Titrationsexperimente mit steigender Nystatindosis bei konstanter Inkubationsdauer ermittelt. Dazu wurden Zellen der exponentiellen Wachstumsphase wie beschrieben mit einer Dichte von 1 g BTM/l in Permeabilisierungspuffer suspendiert und in 1 ml-Aliquots mit steigender Nystatindosis behandelt. Da alle Ansätze aus einer 0,1 %igen Nystatinstammlösung in DMSO pipettiert wurden, konnte bei Zugabe höherer Dosen Nystatin der membranzerstörende Effekt des Lösemittels DMSO (Konzentration 1 % DMSO bei einer Nystatindosis von 10 ng/g BTM) nicht von der spezifischen Wirkung des Nystatins differenziert werden. Als vakuoläre Leitmetabolite wurden basische Aminosäuren (Lysin, Arginin, Ornithin) und Phosphat nach saurer Hydrolyse von Polyphosphaten quantifiziert. Phosphat wird in Form von Polyphosphaten in der Vakuole gespeichert und sollte daher nur teilweise im cytosolischen Extrakt vorhanden sein (Indge 1968, Urech *et al.* 1978). Für das

Cytoplasma wurden Aspartat, Glutamat, Alanin und Glutamin (Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988) sowie Adeninnukleotide und Kaliumionen als Leitmetabolite betrachtet. Weiterhin wurde eine Analyse der freien Nystatinkonzentration in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis durchgeführt, um die spezifische Bindung an die Plasmamembran zu dokumentieren. Ein weiterer Nachweis für die Intaktheit der Vakuolen nach der Extraktion cytoplasmatischer Metabolite sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie erbracht werden. Eine typische Titrationsreihe mit Freisetzung von Aminosäuren ist in Abbildung 8 dargestellt.



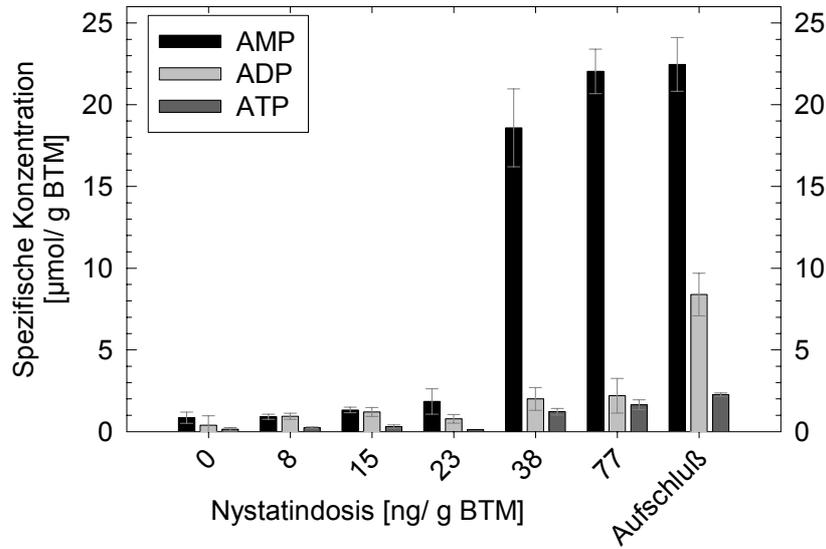
**Abbildung 8** Abhängigkeit der Konzentration **A.** vorwiegend cytosolischer (Glu, Ala, Gln) und **B.** vakuolärer (Lys, Arg, Orn) Aminosäuren im Zellpermeabilisat von der Nystatindosis (Extraktionsdauer 15 min/ 30 °C), gemessen mittels *reversed phase* HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c Übernachtskultur auf CBSS-Medium bei  $OD_{600} = 1,5$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Es wurde ein biphasisches Auftreten von Aminosäuren im Permeabilisat in Abhängigkeit von der Nystatindosis gefunden. Bei einer Dosis von etwa 20-30 ng Nystatin/ g BTM war

annähernd eine konstante Konzentration im Permeabilisat zu beobachten, wobei vorwiegend cytosolische Aminosäuren freigesetzt wurden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war bei einer Dosis von 20 ng Nystatin/ g BTM sehr gut. Bei Erhöhung der Nystatindosis wurden sukzessive auch typisch vakuoläre Leitmetabolite extrahiert. Damit wurde eine selektive Permeabilisierung für cytosolische Aminosäuren bei einer Nystatindosis von 20-30 ng/ g BTM und einer Inkubationsdauer von 15 min bei 30 °C erreicht. Der dynamische Bereich, also eine von der Dosis nahezu unabhängige Wirkung des Antibiotikums, wurde zwischen 15 und 30 ng Nystatin/ g BTM beobachtet, so daß diese Methode auch bei schwankender Zellkonzentration mit denselben Parametern anwendbar war. Bei exponentiell wachsenden Zellen wurde bei einer Verdopplung der Zellmasse pro Ansatz annähernd die gleiche Selektivität wie in Abbildung 8 erreicht. In erster Näherung wurde also eine Konzentrations-Wirkungskorrelation des Nystatins gefunden, so daß die Permeabilisierung bei einer konstanten Konzentration (0,002 % Nystatin/ 2 % DMSO) als Routinemethode verwendet werden konnte.

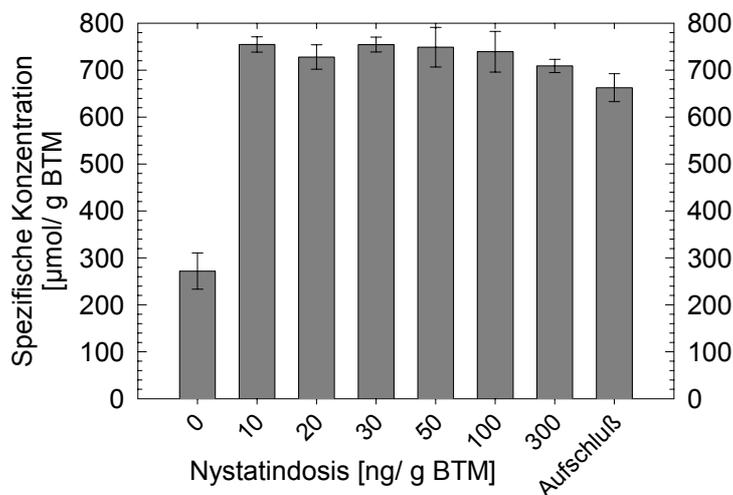
Die Analyse von Phosphat in den Permeabilisaten ergab ebenfalls eine zweistufige Titrationskurve mit einem deutlichen Plateau zwischen 10 und 30 ng Nystatin/ g BTM, etwa 30 % des Gesamtphosphats waren cytosolisch lokalisiert (nicht abgebildet). Diese Beobachtung unterstützt die Folgerungen der Aminosäureanalyse bezüglich der Selektivität und Dynamik der Nystatinextraktion.

In Abbildung 9 ist die Freisetzung von Nukleotiden unter den angegebenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Nystatindosis gezeigt. Diese Metabolite sollten fast ausschließlich cytosolisch lokalisiert sein und müßten somit bei einer Nystatindosis um 20 ng/ g BTM quantitativ freigesetzt werden. Zu erkennen ist, daß Nukleotide ein anderes Extraktionsverhalten bei Nystatinbehandlung zeigten als cytoplasmatische Aminosäuren. Bei der für cytosolische Aminosäuren selektiven Dosis waren nur etwa 10 % der Adeninnukleotide im Permeabilisat. ATP war in den Permeabilisaten fast vollständig hydrolysiert, was durch die Bestimmung von ATP in den Pellets bestätigt wurde. Ab einer Nystatindosis von etwa 40 ng/ g BTM waren auch die Nukleotide fast quantitativ im Permeabilisat nachweisbar. Bei diesem Experiment war die Zellmasse in den Ansätzen geringfügig höher als 1 g BTM/ l. Die Dosis von 38 ng Nystatin/ g BTM wurde bei einer Nystatinkonzentration von 0,005 % erreicht. Die geringfügig unterschiedliche selektive Nystatindosis kann auf das etwa 2-fach höhere Molekulargewicht der Nukleotide oder ihre hohe negative Ladungsdichte zurückzuführen sein (Avéret *et al.* 1998).



**Abbildung 9** Abhängigkeit der Konzentration der Adennukleotide im Zellpermeabilisat von der Nystatindosis (Extraktionsdauer 15 min/ 30 °C), bestimmt mittels Ionenpaar-RP-HPLC modifiziert nach Patthy *et al.* (1990). *Saccharomyces cerevisiae* 23344c Übernachtskultur auf CBS-Medium bei  $OD_{600} = 5,0$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Ein weiterer Nachweis für die quantitative Freisetzung kleiner cytoplasmatischer Moleküle konnte durch die Messung der Kaliumionen in den Permeabilisaten erbracht werden. In Abbildung 10 ist dargestellt, daß intrazelluläres Kalium schon bei einer sehr geringen Nystatindosis von etwa 10 ng/ g BTM frei diffundiert, also die Plasmamembranen aller Zellen permeabilisiert waren.

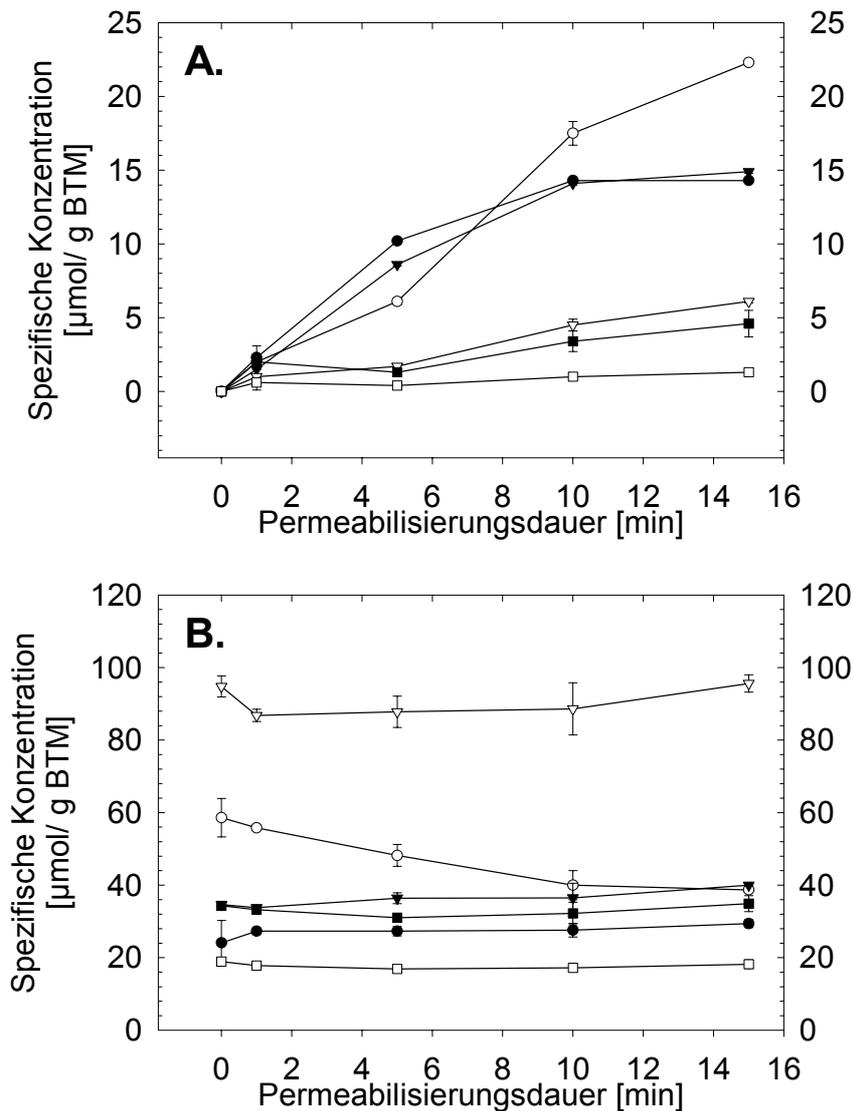


**Abbildung 10** Abhängigkeit der K<sup>+</sup>-Konzentration im Zellpermeabilisat von der Nystatindosis (Extraktionsdauer 15 min/ 30 °C), bestimmt mittels Flammenphotometrie. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c Übernachtskultur auf CBSS-Medium bei  $OD_{600} = 1,8$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Als weiteres Indiz für die Selektivität der Permeabilisierung wurde gezeigt, daß das porenbildende Agens Nystatin unter selektiven Bedingungen nur in sehr geringer Konzentration frei vorliegt, also überwiegend spezifisch, und damit hochaffin, an die Zielmembran bindet. Käufliche Nystatinpräparate bestehen aus mehreren Isomeren (Thomas *et al.* 1982). In den Permeabilisaten konnten durch RP-Ionenpaar-HPLC parallel zu den Nukleotiden drei Isomere des Nystatins anhand ihres charakteristischen UV-Spektrums identifiziert werden. Im Bereich der selektiven Wirkung des Antibiotikums (10-30 ng/ g BTM) waren nur etwa 5-20 % des zugesetzten Polyens frei im Zellüberstand, bei einer Erhöhung der Dosis auf 100 ng/ g BTM aber etwa 65 %. Diese Beobachtung bestätigt die selektive Wirkung des Nystatins bei einer Dosis von 10-30 ng/ g BTM. Aus den Ergebnissen wird auch deutlich, daß die Porenstruktur, die sich in der Plasmamembran mit Nystatin bildet, oder die Größe der Poren von der Nystatindosis abhängt, da ein deutlicher Unterschied der freien Diffusion zwischen Nukleotiden ( $M_r$  etwa 330, permeabel ab etwa 40 ng/ g BTM), Aminosäuren ( $M_r$  etwa 110, permeabel bei 20 ng/ g BTM), Glycerol ( $M_r$  92, permeabel bei 10 ng/ g BTM, siehe 3.5.2) und kleinen Ionen ( $K^+$ , permeabel bei 10 ng/ g BTM) beobachtet wurde (siehe auch Avéret *et al.* 1998).

### **3.1.2 Permeabilisierungskinetik**

Die in 3.1.1 beschriebenen Experimente dokumentieren die selektive Wirkung des Antibiotikums Nystatin auf die Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae*. Dies konnte für die selektive Extraktion von Aminosäuren und anderen kleinen Metaboliten aus dem Wildtypstamm 23344c genutzt werden. Die quantitative Ausbeute der selektiven Extraktion wurde durch Bestimmung von Kaliumionen in den Permeabilisaten nachgewiesen und sollte durch Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Freisetzung von Aminosäuren bei einer selektiven Nystatindosis von 20 ng/ g BTM bestätigt werden. Dazu wurde die Permeabilisierung nach verschiedenen Inkubationszeiten durch Zentrifugation der Zellen wie beschrieben gestoppt und eine Aminosäureanalyse in den Permeabilisaten durchgeführt. Parallel wurde die Kinetik nach Zugabe von 150  $\mu$ M (Endkonzentration im Ansatz) aller zu detektierenden Aminosäuren aufgenommen. In Abbildung 11 A. ist die Permeabilisierungskinetik für die wichtigsten Aminosäuren dargestellt, Abbildung 11 B. zeigt die Bilanz aus vakuolärem und cytosolischem Gehalt in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer. Die Ergebnisse des Experiments mit aufgestockten Proben sind in 6.2 in Tabelle 17 aufgeführt.



**Abbildung 11** Zeitverlauf der Freisetzung vorwiegend vakuolärer (Arg ▽, Lys □, Orn ■) und cytosolischer (Ala ●, Glu ○, Gln ▼) Aminosäuren mit 20 ng Nystatin/g BTM, gemessen mit RP-HPLC nach OPA-Mercaptoethanolderivatisierung. **B.** Summe aus vakuolärem und cytosolischem Extrakt in Abhängigkeit von der Permeabilisierungsdauer. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c Übernachtskultur auf CBS-Medium bei  $OD_{600} = 2,2$ ; Doppelbestimmung (Fehler = s).

Die hauptsächlich im Cytoplasma lokalisierten Aminosäuren Alanin und Glutamin zeigten, wie alle anderen analysierten Aminosäuren außer Glutaminsäure (siehe 6.2), eine Sättigung der Freisetzung bei einer Inkubationsdauer von etwa 10-12 min. Die Freisetzung von Glutamat zeigte keine Sättigung, und nur etwa 30 % des Gesamtgehalts waren nach 15 min im Permeabilisat zu finden. Dagegen wurden vakuoläre Marker, vor allem Lysin, das in *Saccharomyces cerevisiae* in hoher Konzentration cytotoxisch ist (Sumrada und Cooper 1978) und somit fast ausschließlich in der Vakuole vorliegt, in 15 Minuten nur zu einem sehr

geringen Teil freigesetzt. Damit konnte eine quantitative und spezifische Freisetzung cytoplasmatischer Aminosäuren mit der beschriebenen Methode gezeigt werden, allerdings war diese Methode für Glutamat und Aspartat nicht reproduzierbar zu verwenden.

Da die Extraktion bei 30 °C durchgeführt wurde, konnte ein enzymatischer Abbau von Aminosäuren während der Inkubation nicht ausgeschlossen werden. Abbildung 11 B. zeigt die konstante Gesamtkonzentration der wichtigsten Aminosäuren im Extraktionsansatz über 15 Minuten, allerdings wurde für Glutaminsäure, den zentralen Metaboliten (siehe Abbildung 2 in 1.4), ein Verlust von etwa 30-50 % in 15 Minuten in unabhängigen Experimenten gefunden. Da anzunehmen ist, daß der vakuoläre Anteil der Aminosäuren metabolisch inaktiv ist, konnte eine Bestimmung der Glutamatverteilung in der Zelle durch eine Berechnung aus dem vakuolären Gehalt und dem Gesamtgehalt vorgenommen werden.

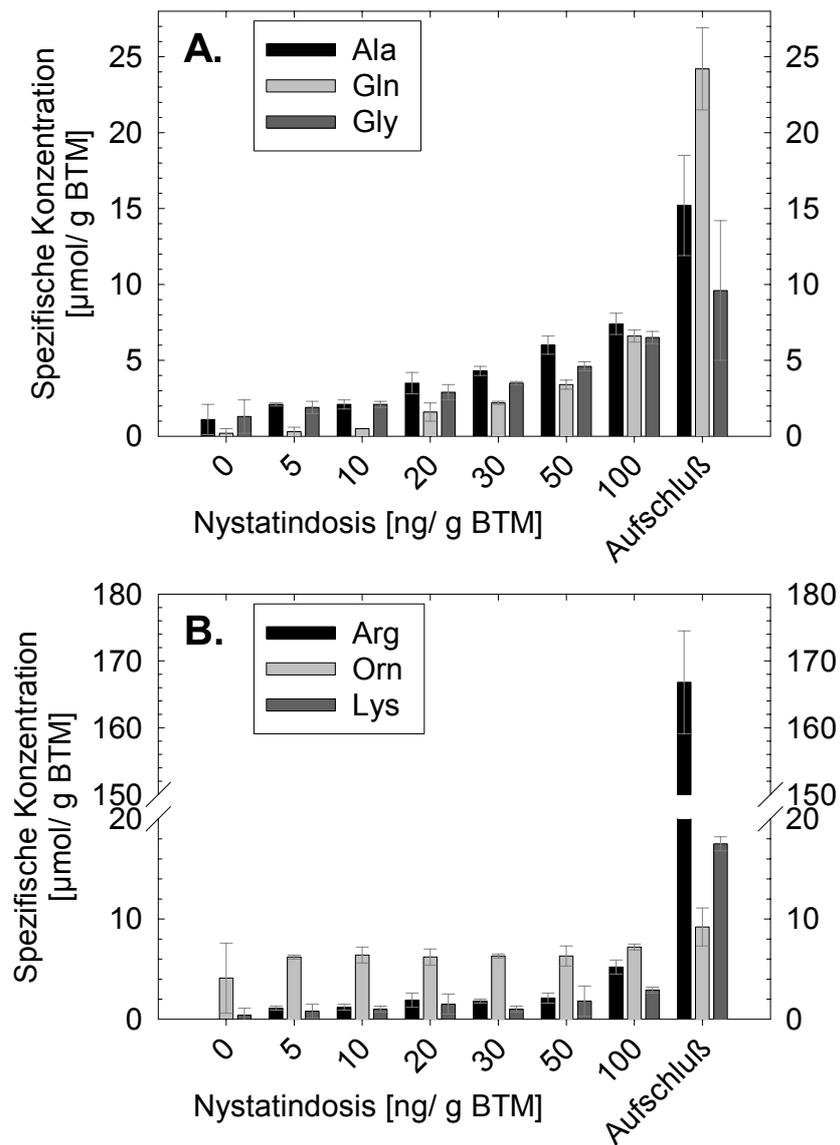
Zellen, die vor der Inkubation mit externen Aminosäuren aufgestockt worden waren, zeigten für Aspartat, Asparagin, Serin und Glutamin eine zu geringe Wiederfindung. Für diese Aminosäuren mußte generell mit einem metabolischen Abbau während der Inkubation gerechnet werden und die Ergebnisse durch Vergleich der extrahierten Mengen (Vakuole + Cytosol) mit dem Gesamtgehalt vor der Permeabilisierung (Zellaufschluß) verifiziert werden. Ein metabolischer Effekt konnte für Zellen, denen extern keine Aminosäuren zugegeben wurden, ausgeschlossen werden, da der Gesamtgehalt aller Aminosäuren über die Inkubationsdauer konstant war (siehe Abbildung 11 B und Abschnitt 6.2).

### **3.1.3 Abhängigkeit der Nystatinwirkung von den Kulturbedingungen**

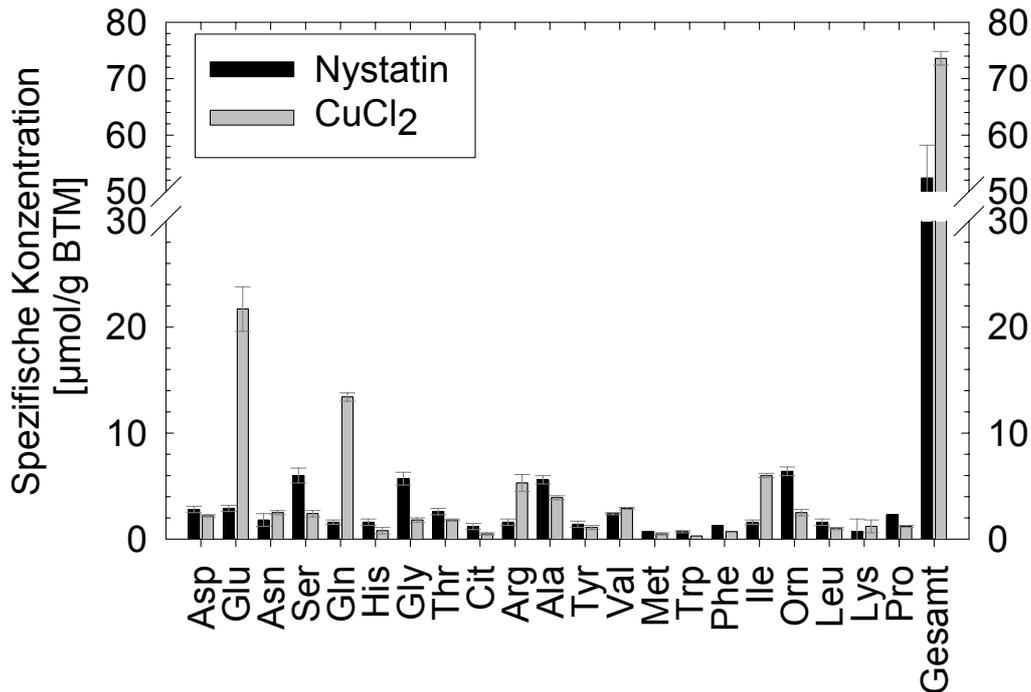
#### **3.1.3.1 Stationäre Kulturen**

Da die differentielle Extraktion von Aminosäuren für ein phänotypisches *screening* von Deletionsstämmen verwendet werden sollte, die unter verschiedenen Bedingungen gewachsen waren, mußte die Abhängigkeit der Nystatinwirkung von verschiedenen Kultivierungsbedingungen gezeigt werden. Dazu wurden Titrationsexperimente wie in 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden aus verschiedenen Wachstumsstadien (siehe auch 3.3.1) und nach Wachstum unter verschiedenen Streß- (siehe 3.5.2, 3.5.3) und Limitationsbedingungen geerntet und permeabilisiert. In Abbildung 12 ist dargestellt, daß bei der Extraktion stationärer Zellen mit Nystatin selbst bei sehr hoher Dosis des Antibiotikums nur ein geringer Anteil der Aminosäuren freigesetzt wurde. Wie schon in 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben, war vor allem der cytoplasmatische Anteil von Glutaminsäure mit etwa 5-10 % erstaunlich gering. Deshalb wurde ein Vergleich zu der von Ohsumi *et al.* (1988) etablierten Kupferpermeabilisierung mit stationären Zellen vorgenommen. Beide Techniken wurden

parallel an drei Zellkulturen durchgeführt (Abbildung 13). Dabei wurden die meisten Aminosäuren in vergleichbaren Mengen freigesetzt. Auffällig ist die Diskrepanz bei Glutamin und Glutamat, die nach der Kupfermethode auch in stationären Zellen vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert waren, mit Nystatin aber nicht extrahiert werden konnten. Weiterhin wurden geringere Selektivitätsunterschiede für Serin, Glycin, Arginin, Isoleucin und Ornithin beobachtet.



**Abbildung 12** Dosisabhängigkeit der Permeabilisierung mit Nystatin bei stationären Zellen. **A.** Cytosolische Leitmetabolite Ala, Gln, Gly, **B.** vakuoläre Marker Arg, Orn, Lys, bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-MPA/FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, stationäre Kultur auf CBSS-Medium bei  $\text{OD}_{600} = 13,4$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).



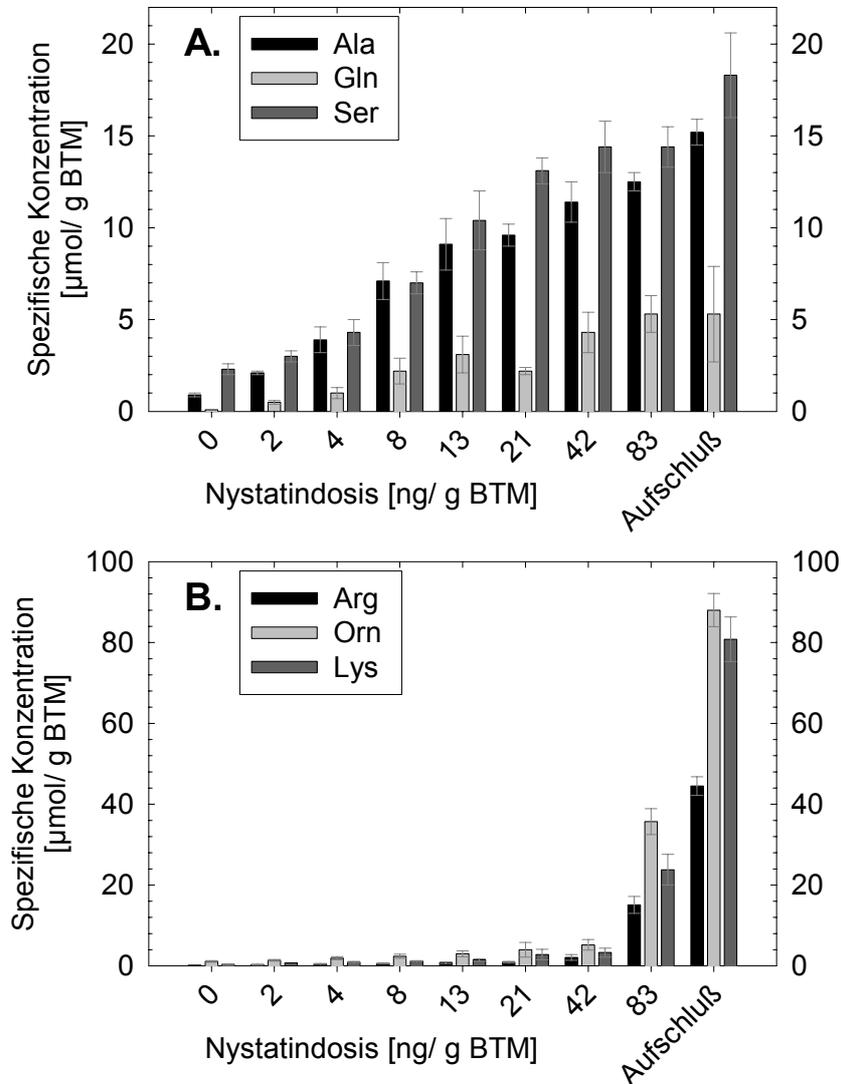
**Abbildung 13** Vergleich der differentiellen Extraktion von Aminosäuren mit Nystatin und Kupferchlorid (Ohsumi *et al.* 1988). Abgebildet sind die bei selektiver Permeabilisierung (20 ng Nystatin/ g BTM bzw. 0,2 mM  $\text{CuCl}_2$ ) extrahierten cytoplasmatischen Aminosäuren, bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-MPA/FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, stationäre Kultur auf CBSS-Medium bei  $\text{OD}_{600} = 13,0$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

In allen anderen Wachstumsstadien von Schüttelkulturen (exponentielles Wachstum  $\text{OD}_{600} = 0,8-5$ , diauxischer *shift*  $\text{OD}_{600} = 6-7$ , siehe 3.3.1) wurde mit Nystatin eine zu der Titrationskurve in Abbildung 8 vergleichbare Selektivität beobachtet.

### 3.1.3.2 Stickstoffmangelkulturen

Da Aminosäuretransporter vor allem bei wechselnder Stickstoffversorgung aktiviert werden, muß eine Permeabilisierungsmethode für das phänotypische *screening* von Deletionsmutanten bei stickstoffgehungerten Kulturen anwendbar sein. Die Permeabilisierungseffizienz wurde in Kulturen bestimmt, die vier Stunden in Medium ohne Stickstoffquelle inkubiert worden waren (Abbildung 14). Wie bereits beschrieben, wurde auch in diesem Fall nur ein sehr geringer cytoplasmatischer Glutaminsäureanteil gemessen (10 % des Gesamtgehalts, nicht abgebildet). Für andere partiell cytoplasmatische Aminosäuren wurde eine zweistufige Abhängigkeit der Permeabilisierungseffizienz von der Nystatindosis beobachtet, allerdings war der Dosisbereich, bei dem eine konstante Konzentration cytosolischer Aminosäuren im Permeabilisat ermittelt wurde, schwach ausgeprägt. Glutamin war zu etwa 90 % cytosolisch

lokalisiert. Basische Aminosäuren wurden fast ausschließlich im vakuolären Extrakt gefunden.



**Abbildung 14** Dosisabhängigkeit der Permeabilisierung mit Nystatin bei stickstoffgehungerten Zellen. **A.** Cytosolische Leitmetabolite Ala, Gln, Ser, **B.** vakuoläre Aminosäuren Arg, Orn, Lys, bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c nach 4 h auf CBSS-Medium ohne Stickstoffquelle bei  $\text{OD}_{600} = 4,0$ . Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Bei Kulturen, die auf Harnstoff oder L-Prolin als Stickstoffquelle gewachsen waren, wurden zu der in Abbildung 8 vergleichbare Titrationskurven erhalten.

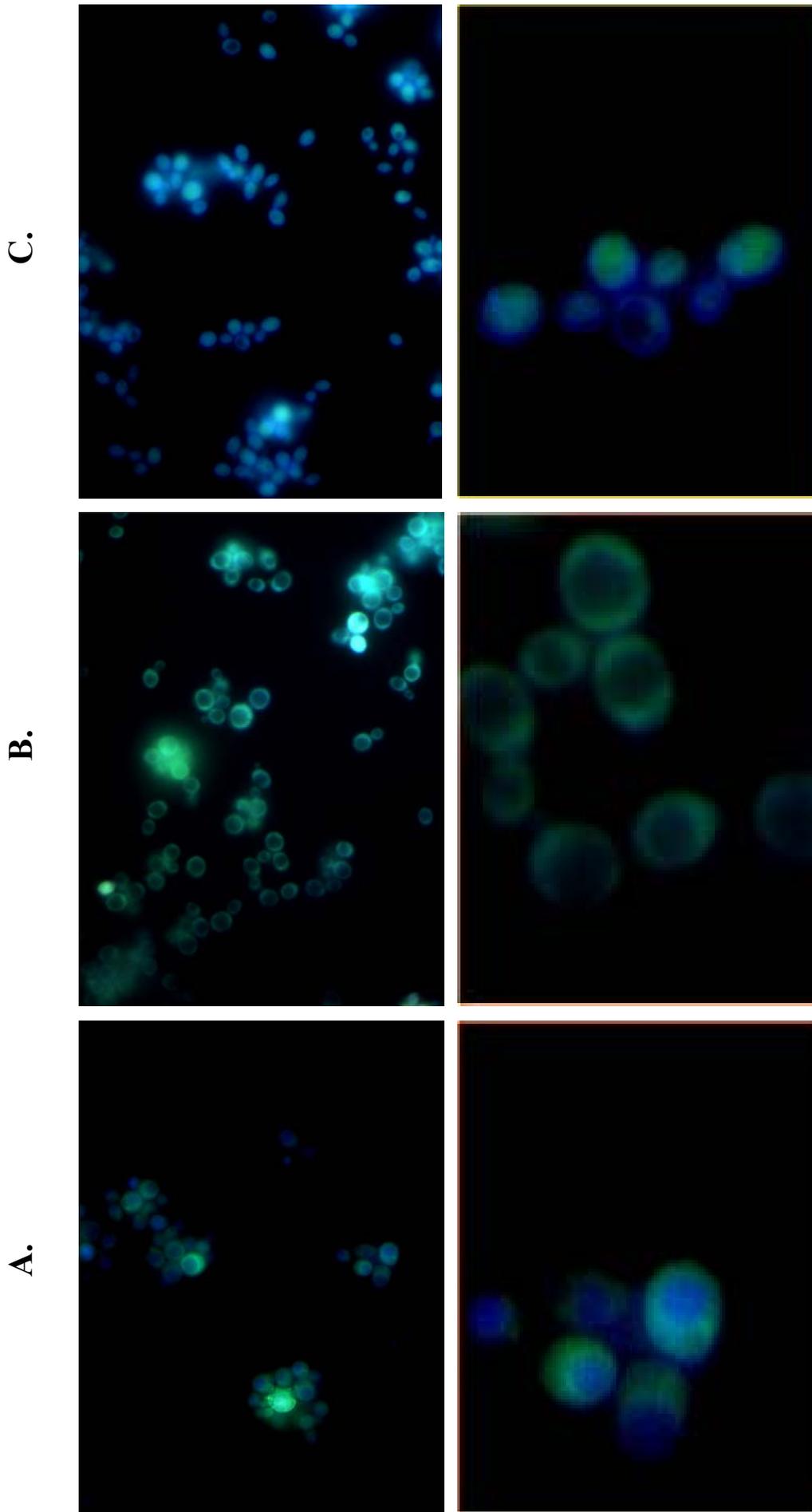
### **3.1.3.3 Hitze-, Kälte-und hyperosmolare Kulturen**

Um die Verteilung der kompatiblen Solute Glycerol und Trehalose sowie der Aminosäuren unter Streßbedingungen zu bestimmen, wurden Nystatindosis-Wirkungskurven nach Hitzeschock, Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen und bei 15 °C aufgenommen. Salz- und Hitzestress führten zu einer geringfügigen Verschiebung des selektiven Bereiches, es wurde aber unter allen Bedingungen eine selektive Freisetzung cytoplasmatischer Metabolite gefunden (siehe 3.5.2, 3.5.3).

### **3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Um die Intaktheit der vakuolären Membran nach der selektiven Permeabilisierung mit Nystatin zu überprüfen, wurde das vakuoläre Lumen vor der Extraktion spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Arg-CMAC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) angefärbt. Um einen besseren Kontrast bei der Mikroskopie zu erreichen, wurde das Cytoplasma parallel mit Acridinorange angefärbt. Nach der selektiven Permeabilisierung (15 min/ 30 °C) wurden die Zellen im Pellet bis zur Mikroskopie auf Eis gelagert.

In Abbildung 15 A sind blau fluoreszierende Vakuolen deutlich vom gelben Cytoplasma zu unterscheiden. Nach der selektiven Permeabilisierung waren intakte Vakuolen dunkel durch die gelbe Färbung des Cytoplasmas zu erkennen, das vakuoläre Lumen war entfärbt. Der blaue Farbstoff war bei UV-Anregung im Cytoplasma zu erkennen. Da nicht bekannt ist, wie Arg-CMAC in der Vakuole immobilisiert wird, könnte dies durch einen Verlust des Protonengradienten und eine freie Diffusion des Farbstoffs bei neutralem pH über die vakuoläre Membran erklärt werden. Bei einer 10-fachen Erhöhung der Nystatindosis war nur noch die unspezifische Anfärbung der gesamten Zelle zu erkennen, vakuoläre Strukturen waren zerstört.



**Abbildung 15** Fluoreszenzmikroskopie nach Doppelfärbung mit Arg-CMAC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) und Acridinorange. **A.** Kontrolle ohne Nystatinbehandlung, **B.** nach selektiver Permeabilisierung mit 20 ng Nystatin/g BTM und **C.** nach Permeabilisierung mit 200 ng Nystatin/g BTM + 20 % DMSO. *Saccharomyces cerevisiae* K1 Übernachtskultur in YM-Medium bei  $OD_{600} = 2,5$ .

### **3.1.5 Stammabhängigkeit der Permeabilisierung mit Nystatin**

Da keine Daten über die Sensitivität verschiedener Wildtypstämme gegenüber Nystatin vorlagen, wurde für alle in dieser Arbeit benutzten Hefe-Wildtypstämme ein Vergleich der Permeabilisierungseffizienz des Nystatins unter Standardbedingungen durchgeführt. Für die Wildtypstämme 23344c, W303p und K26 wurde eine selektive Permeabilisierung der Plasmamembran bei einer Nystatindosis von 20 ng/ g BTM gefunden.

## **3.2 Untersuchung von Deletionsstämmen**

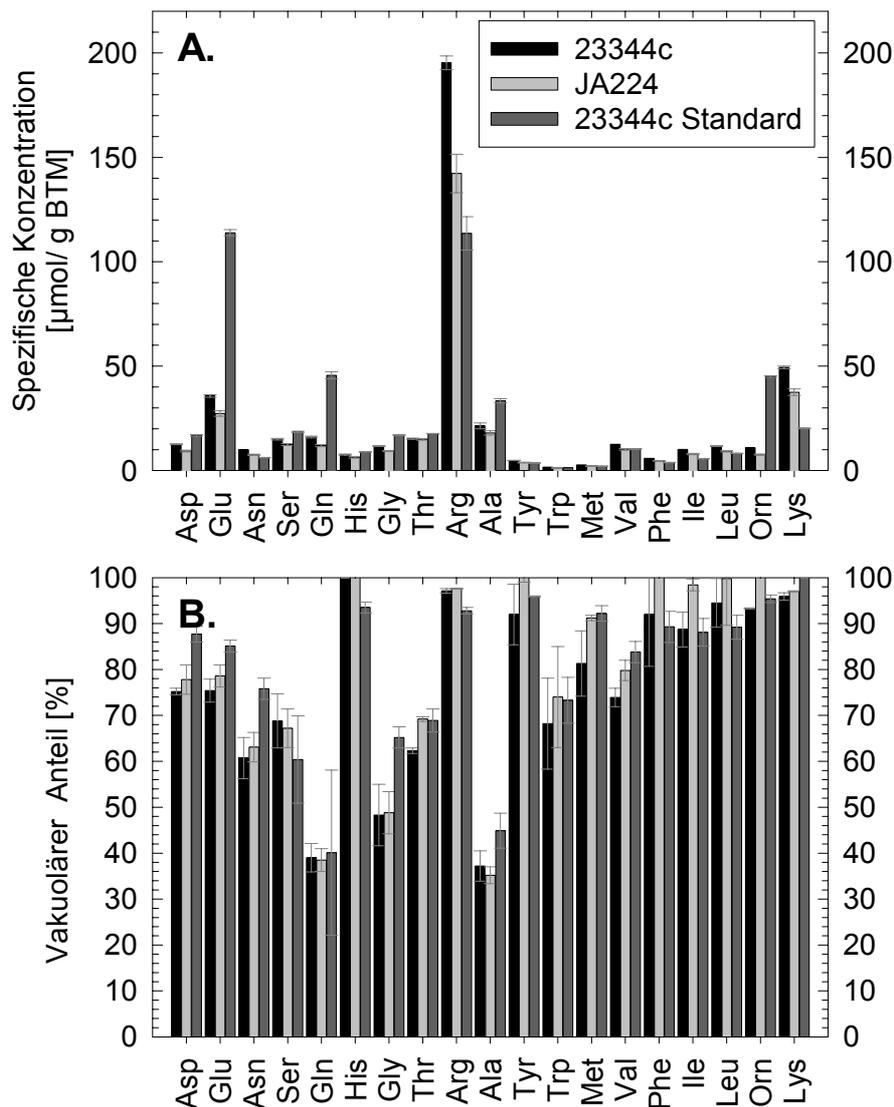
Die Nystatinmethode wurde entwickelt, um mit ihrer Hilfe Gene für Aminosäuretransportproteine in *Saccharomyces cerevisiae* durch ein *screening* ausgewählter Deletionsstämme zu identifizieren. Primäre Ziele der Kompartimentierungsanalysen waren vakuoläre Aminosäuretransporter, für die die ersten Genloci während dieser Arbeit beschrieben wurden (Russnak *et al.* 2001).

### **3.2.1 AAAP-Familie**

Zu Beginn dieser Arbeit waren verschiedene vakuoläre Aminosäureaufnahmesysteme durch biochemische Untersuchungen an transportkompetenten vakuolären Vesikeln charakterisiert. Aufgrund transportkinetischer Studien wurde vermutet, daß sieben Aminosäure-Proton-Antiporter und ein Histidin-Arginin-Antiporter in der vakuolären Membran aktiv sind (Ohsumi und Anraku 1981, Sato *et al.* 1984a/ b). Nach der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* konnten bis zu Beginn der Arbeit keine Gene für vakuoläre Aminosäuretransporter identifiziert werden. Innerhalb einer Kooperation wurden nach *in silico*-Untersuchungen ORFs ausgewählt, die für Auxin- und Aminosäurepermeasen homologe Proteine höherer Pflanzen kodieren (Mitglieder der MFS-Superfamilie, André 1995, Paulsen *et al.* 1998). Deletionsmutanten dieser ORFs standen für eine funktionelle Charakterisierung der Transportprozesse zur Verfügung. Mittlerweile wurden für einige Proteine dieser Genfamilie Funktionen als vakuoläre Aminosäuretransporter beschrieben. Russnak *et al.* (2001) ordneten die Proteine einer vesikulären Aminosäuretransporterfamilie (UNC-47) mit Homologen in Ratte-, Maus- und *Caenorhabditis elegans* Nervenzellen zu.

Da Arginin und Lysin zwei Hauptsubstrate für vakuoläre Importprozesse sind (Ohsumi und Anraku 1981, Sato *et al.* 1984a/ b), wurde zunächst die Aminosäureverteilung der Deletionsstämme bei Wachstum auf diesen Metaboliten als Stickstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Dazu wurden die Kulturen in CBS-Medium mit 0,05 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(1/ 10 Stickstoff) über Nacht bis  $OD_{600} = 1,5-3$  angezogen, dann mit je 10 mM L-Arginin und L-Lysin supplementiert und nach vier Stunden mit Nystatin selektiv permeabilisiert. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefaßt. Dazu ist in Abbildung 16 die Verteilung für die Deletionsmutante JA 224 im Vergleich zum Wildtyp graphisch dargestellt. Die auf Lysin und Arginin gewachsenen Zellen zeigten im Vergleich zu Kulturen auf Ammonium eine etwa 50 % höhere Arginin- und Lysinakkumulation in der Vakuole. Dagegen waren Glutamat und Ornithin 5-fach, Glutamin 3-fach erniedrigt.



**Abbildung 16** Vergleich der Aminosäurekompartimentierung zwischen *S.cerevisiae*. Wildtyp 23344c und Deletionsmutante JA 224. Übernachtskulturen auf CBS-Medium (0,05 % Ammoniumsulfat) wurden in der exponentiellen Phase mit je 10 mM L-Lys und L-Arg supplementiert und nach vier Stunden selektiv mit Nystatin permeabilisiert. Im Vergleich dazu Wildtypzellen (23344c) in der exponentiellen Wachstumsphase auf CBS-Medium. **A.** Gesamtamino­säuregehalt, **B.** vakuolärer Anteil bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-Mercaptoethanol-Derivatisierung; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

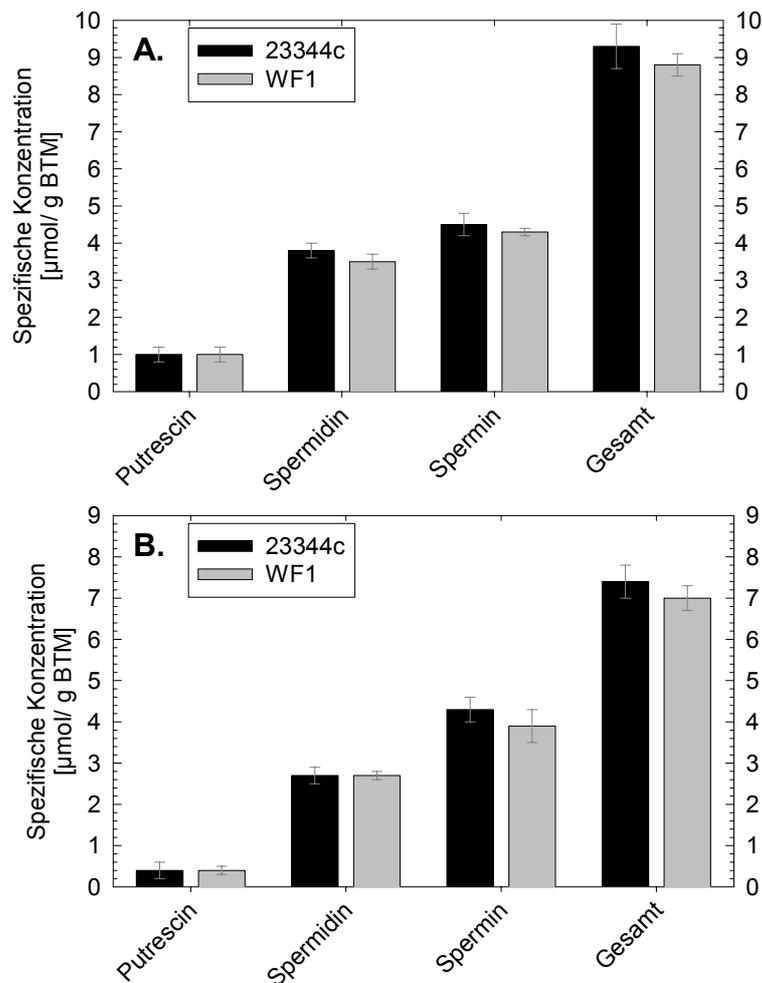
Für die Stämme JA 254 und JA 224 wurde eine zum Wildtyp erhöhte bzw. erniedrigte Argininakkumulation gefunden (Abbildung 16, Tabelle 9). Da beide in der Doppelmutante JA 254 deletierten ORFs (*YER119c* und *YIL088c*) in den Einzeldelentionsstämmen (JA 226 und JA 228) keinen Phänotyp zeigten, könnte eine Redundanz zweier Transportsysteme vorliegen. Da aber beide Phänotypen quantitativ schlecht reproduzierbar waren, wurde ein Artefakt in der Bestimmung der Verteilung bei diesen Kulturbedingungen vermutet. Es wurde unter den angegebenen Bedingungen die Vitalität der Zellen von Wildtyp und der Mutante JA 224 mittels Methylenblaufärbung und Wachstum auf Agarplatten (Kolonienzahl, CFU) untersucht. Es wurde für Deletionsmutanten und Wildtyp innerhalb der vier Stunden Inkubation mit Lysin und Arginin ein Rückgang lebensfähiger Zellen auf etwa 50 % mit beiden Methoden gefunden. Das Sterben der Zellen konnte durch Pufferung des Mediums mit Natriumsuccinat bei pH 5,5 (CBSS-Medium) verhindert werden. In ungepufferten Kulturen wurde ein pH von etwa 2,8 bis 3,0 unmittelbar vor der Ernte gemessen. In gepufferten Kulturen konnte der oben beschriebene Phänotyp nicht reproduziert werden. Russnak *et al.* (2001) beschrieben mittlerweile den ORF *YER119c* als Gen eines vakuolären Aspartat- und Glutamatexporters, womit der beobachtete Phänotyp kaum zu erklären ist. Die Unterschiede der Argininakkumulation waren wahrscheinlich durch die in Schüttelkultur nicht exakt reproduzierbaren Anteile lebender Zellen begründet.

Weiterhin wurde für den Dreifachdeletionsstamm JA 296 eine geringfügige und quantitativ schwer reproduzierbare Verschiebung von Glutamin in die Vakuole gefunden. Der isogene Stamm JA 298 zeigte diesen Effekt nicht. Russnak *et al.* (2001) beschrieben später, daß zwei in diesen Stämmen deletierte Gene (ORF *YKL146w* und *YNL101w*) für vakuoläre Glutamin-(Asparagin)-/ Tyrosin-/ Isoleucin- (Leucin-)-Exporter codieren, das dritte deletierte Gen für einen Importer gleicher Spezifität. Die Einzeldelation des beschriebenen Importers im Stamm JA 230 führte zu keinem meßbaren Effekt. Weitere physiologische Untersuchungen dieser Stämme wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Weinand (2001)) durchgeführt. Es konnten keine Deletionsphänotypen beschrieben werden.

### **3.2.2 Deletion im ORF YCR023c**

Das Genprodukt dieses ORFs konnte durch Markierungsexperimente in der vakuolären Membran lokalisiert werden (M. Albertsen, persönliche Mitteilung). Nach *in silico*-Analysen wurde das Genprodukt als putatives MFS-Protein ( $H^+$ -Antiporter), das Homologie zu Entgiftungssystemen aufweist, beschrieben (Paulsen *et al.* 1998). Laborinterne Datenbankanalysen und Topologievorhersagen identifizierten ein für Polyamintransporter konserviertes Motiv (M. Albertsen, persönliche Mitteilung). Es wurde eine selektive

Extraktion mit Nystatin und eine Analyse der Aminosäuren und Polyamine mittels RP-HPLC durchgeführt; dabei wurde kein Unterschied des Aminosäuregehalts und der Aminosäureverteilung in exponentiell wachsenden Kulturen im Vergleich zum Wildtyp gefunden (CBSS-Medium,  $OD_{600} = 1,5$ ). Die Analyse der Polyamine ist in Abbildung 17 dargestellt. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp gefunden.



**Abbildung 17** Vergleich des Polyamingehalts, ermittelt durch RP-HPLC, zwischen *S.c.* Wildtyp 23344c und der Deletionsmutante WF 1 nach selektiver Extraktion mit 20 ng/g BTM Nystatin. **A.** Gesamtpolyamingehalt, **B.** vakuolärer Gehalt. Übernachtskulturen auf CBSS-Medium bei  $OD_{600} = 2,5$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Etwa 90 % aller Polyamine waren im vakuolären Extrakt zu finden, Putrescin war nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Es wurde kein Hinweis auf eine Funktion des deletierten Gens bei der vakuolären Polyaminkompartimentierung gefunden. Eine Messung der Polyaminaufnahme in intakte vakuoläre Vesikel der Deletionsmutante zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp (I. Bellahn, persönliche Mitteilung).

### 3.2.3 ORF YGR138c und YNL065w

Durch Genexpressionsanalysen mit Stämmen, die lacZ-Fusionen dieser ORFs trugen, konnte eine konstitutive Expression beider Gene gefunden werden (M. Albertsen, persönliche Mitteilung). Beide ORFs zeigen wie *YCR023c* Homologie zu Genen von H<sup>+</sup>-Antiportern, die für die Entgiftung toxischer Substanzen wichtig sind (Paulsen *et al.* 1998). Eine Analyse der subzellulären Aminosäureverteilung exponentiell wachsender Kulturen auf CBSS-Medium mit Nystatin zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp.

### 3.2.4 ORF YMR126c

Ein Deletionsstamm dieses ORFs wurde durch Transposonmutagenese als kältesensitiv bei Wachstum bei 15°C identifiziert (de Jesus Ferreira *et al.* 2001). Die Deletion in einem auxotrophen Wildtyphintergrund (W303-1A-126) zeigte eine Induktion der Gene *ARG1*, *MET14* und *PUT4* nach Überführen der Kulturen von 30 °C auf 15 °C (M. de Jesus Ferreira, persönliche Mitteilung). Daher wurde ein Zusammenhang zum Aminosäurestoffwechsel vermutet. Es wurde eine Bestimmung der subzellulären Aminosäureverteilung im prototrophen Wildtyphintergrund (W303p) nach Wachstum bei 15 °C und eine Bestimmung der selektiven Nystatindosis durchgeführt. Stationäre Vorkulturen in CBSKP-Medium wurden nach Wachstum bei 30 °C mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bei 15 °C in frischem Medium inokuliert und bei einer OD<sub>600</sub> von 1,1 (W303p nach 19,5 h, W303-p-126 nach 24 h) selektiv mit Nystatin permeabilisiert. Durch Titrationsexperimente wurden die in 3.1.1 beschriebenen selektiven Extraktionsbedingungen bestätigt. In Tabelle 8 sind die Aminosäuregehalte und -verteilungen im Wildtyp und der Deletionsmutante dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Der cytosolische Aminosäureanteil war unter diesen Bedingungen mit etwa 50 % des Gesamtgehalts relativ hoch. Ein Vergleich mit der Aminosäurekonzentration unter Standardbedingungen ist in Abbildung 18 für den Wildtyp gezeigt.

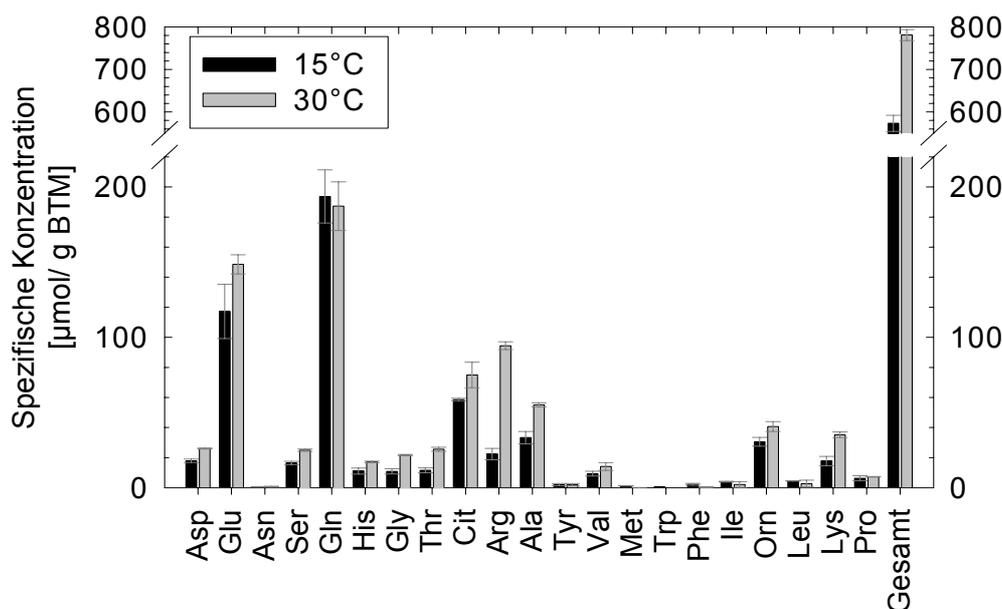
Der Gesamtaminosäuregehalt war bei 15 °C erniedrigt, vor allem Glutaminsäure, Arginin, Alanin, Citrullin und Lysin waren deutlich niedriger konzentriert. Bei 15 °C wurde für fast alle Aminosäuren ein größerer Anteil im Cytoplasma gefunden. Die Konzentration im Cytoplasma, ausgehend von konstanten Zellvolumina, war bei 15 °C erniedrigt, lediglich die cytosolische Glutaminkonzentration war um etwa 30 % höher. Auffällig war die hohe Citrullinkonzentration in diesem Stamm, die beim Wildtyp 23344c vielfach geringer war (siehe Tabelle 8).

In Tabelle 9 ist eine Übersicht über alle Messungen der Deletionsmutanten wiedergegeben.

-Ergebnisse-

**Tabelle 8** Aminosäureverteilung im Deletionsstamm W303-p-126 im Vergleich zum Wildtyp nach selektiver Extraktion mit Nystatin, bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. Wachstum auf CBSKP-Medium bei 15 °C bis OD<sub>600</sub> = 1,1; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Stamm	W303p				W303-126p			
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		% vakuolär	
Asp	17,9	+/- 1,1	40,9	+/- 1,7	20,5	+/- 1,7	36,2	+/- 4,8
Glu	117,2	+/- 18,1	36,2	+/- 2,2	117,6	+/- 10,1	28,3	+/- 3,7
Asn	0,7	+/- 0,1	45,7	+/- 8,7	1,5	+/- 0,7	65,3	+/- 3,0
Ser	16,5	+/- 1,0	32,6	+/- 2,6	16,9	+/- 2,4	28,4	+/- 3,6
Gln	193,7	+/- 17,7	53,5	+/- 4,7	215,4	+/- 10,6	41,1	+/- 3,1
His	11,1	+/- 2,0	69,0	+/- 1,3	10,8	+/- 0,6	60,3	+/- 3,4
Gly	10,9	+/- 1,7	35,2	+/- 2,1	10,8	+/- 1,0	29,6	+/- 3,7
Thr	11,6	+/- 1,6	55,5	+/- 3,4	12,5	+/- 0,7	49,4	+/- 2,7
Cit	58,7	+/- 0,8	50,9	+/- 2,4	71,3	+/- 6,6	45,3	+/- 1,9
Arg	22,4	+/- 3,8	86,5	+/- 3,8	21,3	+/- 1,2	79,4	+/- 3,6
Ala	33,3	+/- 4,1	29,5	+/- 3,2	31,9	+/- 3,8	25,0	+/- 1,4
Tyr	2,1	+/- 0,7	64,8	+/- 1,5	2,3	+/- 0,3	70,8	+/- 2,0
Val	9,4	+/- 1,6	47,0	+/- 3,3	9,1	+/- 0,7	38,9	+/- 2,0
Met	1,3	+/- 0,1	46,1	+/- 3,6	1,4	+/- 0,5	51,8	+/- 1,5
Trp	0,6	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0	0,7	+/- 0,2	0,0	+/- 0,0
Phe	2,3	+/- 0,6	0,0	+/- 0,0	2,3	+/- 1,1	0,0	+/- 0,0
Ile	4,0	+/- 0,3	47,4	+/- 4,3	3,7	+/- 1,0	36,4	+/- 4,9
Orn	30,6	+/- 2,9	78,1	+/- 5,3	39,2	+/- 3,2	73,0	+/- 2,8
Leu	4,6	+/- 0,2	55,9	+/- 8,1	5,4	+/- 0,7	53,8	+/- 0,8
Lys	17,8	+/- 3,1	88,9	+/- 5,3	20,6	+/- 0,1	85,1	+/- 1,8
Pro	6,3	+/- 1,7	19,0	+/- 6,4	9,7	+/- 3,5	15,3	+/- 9,1
<b>Gesamt</b>	<b>573,2</b>	<b>+/- 18,9</b>	<b>50,9</b>	<b>+/- 3,0</b>	<b>624,9</b>	<b>+/- 31,6</b>	<b>42,6</b>	<b>+/- 3,3</b>



**Abbildung 18** Vergleich der Aminosäuregehalte des *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyps W303-p, abhängig von der Wachstumstemperatur, gemessen in exponentiell wachsenden Kulturen (OD<sub>600</sub> = 1,5-2,0) bei 15 °C und 30 °C mit RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

-Ergebnisse-

**Tabelle 9** Ergebnisse der Messung der Aminosäureverteilung verschiedener Deletionsmutanten.

<b>Stammbezeichnung</b>	<b>Wachstumsbedingungen</b>	<b>Phänotyp</b>
<b>23344c</b> Wildtyp	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-70-80% aller Aminosäuren vakuolär.
	-YNB 0,05 % Ammonium-sulfat	
<b>JA 293</b> <i>yer119cΔ yil088cΔ</i> <i>yel064::KanMX</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.
	-YNB 0,05 % Ammonium-sulfat	
<b>JA 295</b> <i>yil088cΔ yer119cΔ</i> <i>yel064cΔ::KanMX</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.
	-YNB 0,05 % Ammonium-sulfat	
<b>JA 296</b> <i>ynl101wΔ ykl146wΔ</i> <i>yjr001wΔ::KanMX</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.  -Glutamin in der Vakuole bei gleichem Gesamtgehalt etwa 30 % erhöht.
	-YNB 0,05 % Ammonium-sulfat	
<b>JA 254</b> <i>yil088cΔ yer119cΔ</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-20-30 % höherer Gesamtarginin- gehalt auf ungepuffertem Medium.
<b>JA 224</b> <i>yel064cΔ</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-10-25 % höherer Gesamtarginin- gehalt auf ungepuffertem Medium, kein Phänotyp auf CBSS.
<b>JA 226</b> <i>yer119cΔ</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.
<b>JA 228</b> <i>yil088cΔ</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.
<b>JA 230</b> <i>yjr001wΔ</i>	-CBS 5 % Ammonium-sulfat + 4 h 10 mM Arg/ Lys	-Kein Phänotyp.
<b>WF 1</b> <i>ycr023cΔ::lacZ</i>	-CBSS	-Kein Phänotyp (Polyamine und Aminosäuren).
<b>RK 15</b> <i>ygr138cΔ::KanMX</i>	-CBSS	-Kein Phänotyp
<b>JA 324</b> <i>ynl065wΔ::KanMX</i>	-CBSS	-Kein Phänotyp
<b>W303-p-126</b> <i>yml126cΔ::KanMX4</i>	-CBSKP, 15 °C	-Kein Phänotyp

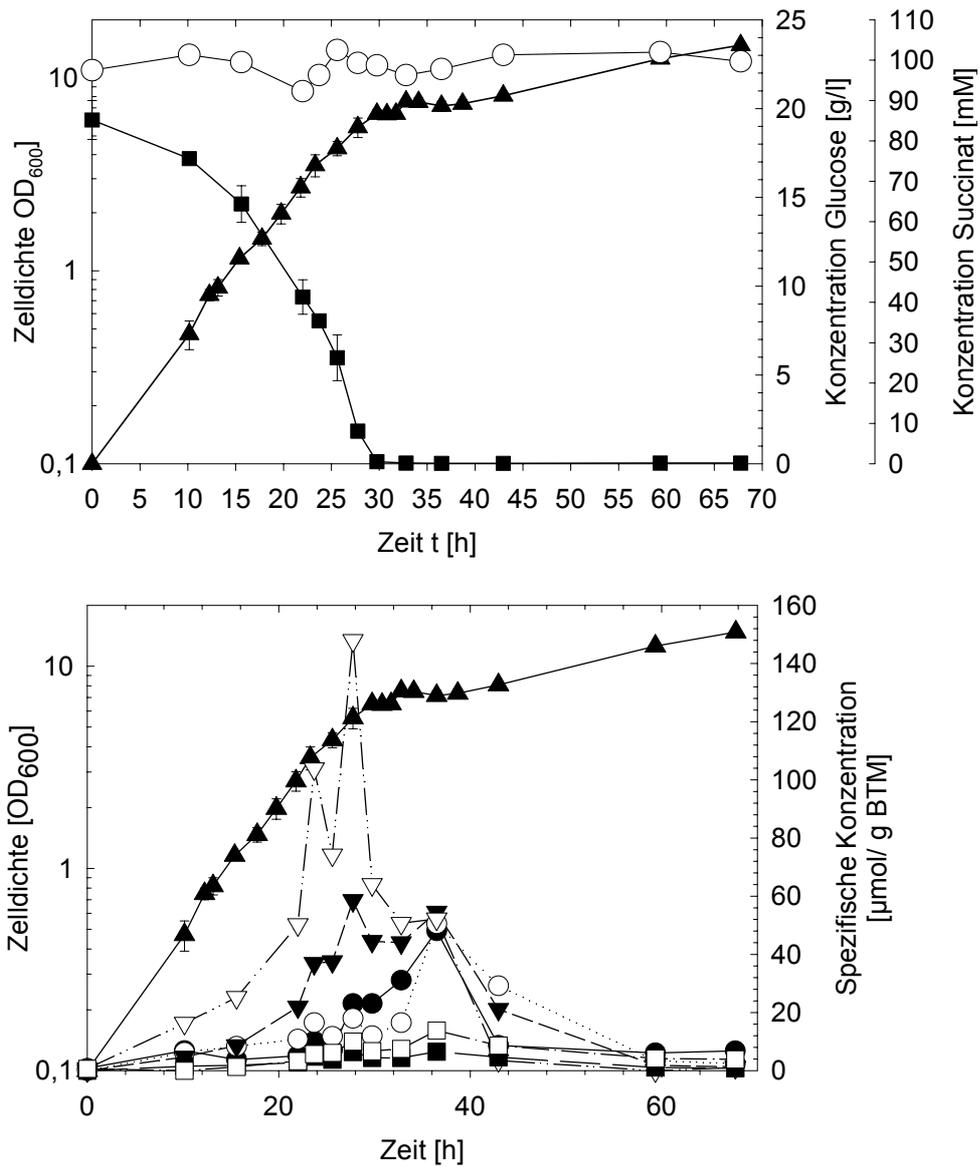
Es konnte in keinem der untersuchten Deletionsstämme ein Unterschied der Metabolitverteilung zum Wildtyp gefunden werden. Daher sollten physiologische Bedingungen definiert werden, unter denen ein verstärkter Transport von Aminosäuren über die vakuoläre Membran stattfindet.

### **3.3 Dynamische Messungen der Aminosäureverteilung**

Dynamische Studien mit der Wildtypzelllinie 23344c sollten nach Überführen von exponentiell wachsenden Zellen in Stickstoff-Hungermedium (*downshift*) und zurück auf komplettes Medium (*upshift*) *in vivo* die Zeitspanne identifizieren, in der verstärkt Aminosäuren über den Tonoplasten transportiert werden. Weiteres Ziel war es, den Einfluß der Wachstumsstadien in Schüttelkultur auf Aminosäuregehalt und -verteilung im Wildtypstamm 23344c zu bestimmen (siehe auch Hans *et al.* 2001). Dieser Stamm ist für physiologische Studien des Stickstoffmetabolismus sehr gut geeignet, da er die *perl*-Mutation (früher *amc*<sup>+</sup>) nicht trägt, die unter anderem auch die im *Saccharomyces*-Genomprojekt verwendeten Stämme weniger sensitiv für Ammoniumrepression macht, genetisch aber nicht charakterisiert ist (ter Schure *et al.* 2000).

#### **3.3.1 Aminosäureverteilung und Wachstum**

In Abbildung 19 A. ist eine Wachstumskurve auf CBSS-Medium, kombiniert mit der Glucose- und Succinatkonzentration (um die metabolische Inertheit des Puffers zu dokumentieren) im Medium dargestellt. In Abbildung 19 B. ist zur Wachstumskurve die Konzentration der quantitativ wichtigsten Aminosäuren im Kulturmedium abgebildet. Auffällig ist das Auftreten deutlich erhöhter Aminosäurekonzentrationen im Medium im Bereich des diauxischen *shifts*, dem Bereich der Wachstumskurve, in dem Glucose unter etwa 1-2 mM fällt und die Zellen auf respirativen Stoffwechsel umstellen. Zu erkennen ist dies am Knick der Wachstumskurve. Schon ab einer Verminderung der anfänglichen Glucosekonzentration um etwa 50 % unter glucoselimitierten Wachstumsbedingungen ist eine Umstellung des Zentralstoffwechsels mit einer Akkumulation von Glykogen zu beobachten, im Bereich des diauxischen *shifts* akkumuliert zusätzlich Trehalose in der Zelle (Lillie und Pringle 1980, Parrou *et al.* 1999). Weiterhin wurde gezeigt, daß im diauxischen Bereich des Wachstums das vakuoläre Volumen zunimmt (Asami und Yonezawa 1995).



**Abbildung 19** Wachstum (▲) von *Saccharomyces cerevisiae* 23344c auf CBSS-Medium. **A.** Glucose (□) und Succinat (○) im Kulturüberstand, **B.** Quantitativ wichtige Aminosäuren im Kulturüberstand (Ala (▽), Gly (▼), Glu (●), Gln (○); Orn (□), Cit (■)) bestimmt durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung.

Um den Einfluß der Wachstumsphase auf interne Aminosäurekonzentrationen zu untersuchen, wurden Zellen bei verschiedenen OD<sub>600</sub>-Werten geerntet und selektiv mit Nystatin permeabilisiert. Die Permeabilisate wurden mittels RP-HPLC analysiert. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst.

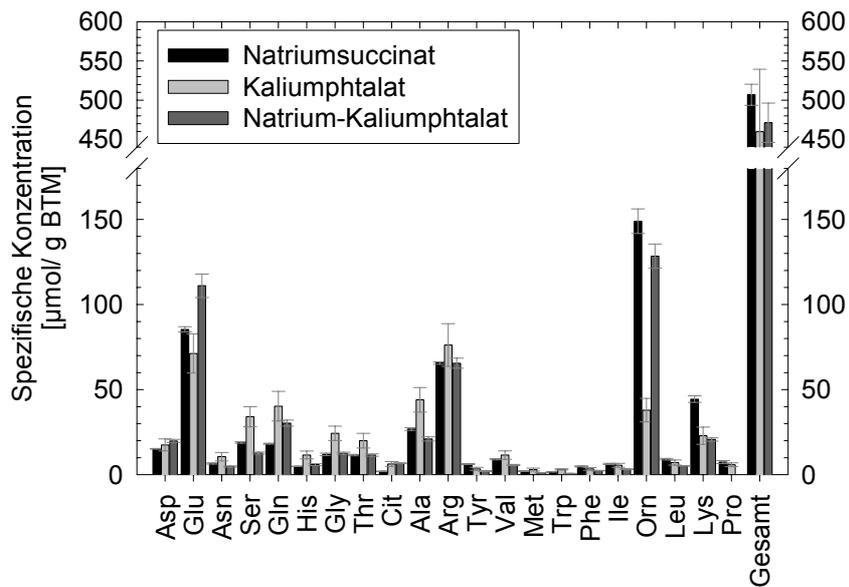
-Ergebnisse-

**Tabelle 10** Aminosäurepools in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, ermittelt durch selektive Nystatin-Permeabilisierung und RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *S.c.* 23344c, CBSS-Medium.

Aminosäure	Frühe exponentielle Phase (OD <sub>600</sub> = 0,8)			Exponentielle Phase (OD <sub>600</sub> = 1,8)		
	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär	
Asp	15,7 +/- 0,7	72,8 +/- 6,0		23,7 +/- 1,8	79,9 +/- 7,2	
Glu	83,3 +/- 2,3	78,5 +/- 4,5		110,7 +/- 2,9	81,5 +/- 3,8	
Asn	4,8 +/- 0,1	31,9 +/- 1,7		8,2 +/- 0,6	48,8 +/- 4,1	
Ser	14,4 +/- 0,4	44,0 +/- 3,0		20,6 +/- 1,1	60,4 +/- 6,2	
Gln	19,4 +/- 1,0	34,8 +/- 2,5		31,5 +/- 1,8	42,9 +/- 5,2	
His	5,1 +/- 0,1	59,7 +/- 4,6		7,7 +/- 0,3	76,9 +/- 5,3	
Gly	9,5 +/- 0,2	28,6 +/- 1,2		13,7 +/- 1,0	42,7 +/- 4,0	
Thr	10,1 +/- 0,3	36,8 +/- 0,3		15,2 +/- 1,2	52,8 +/- 5,0	
Cit	2,4 +/- 0,2	53,6 +/- 8,0		2,9 +/- 0,3	76,0 +/- 3,3	
Ala	23,1 +/- 1,1	19,9 +/- 1,7		41,5 +/- 3,1	42,2 +/- 5,6	
Arg	133,1 +/- 3,9	78,1 +/- 3,9		70,0 +/- 1,6	86,5 +/- 2,7	
Tyr	6,0 +/- 0,2	67,9 +/- 3,7		8,4 +/- 0,4	80,3 +/- 5,0	
Val	8,4 +/- 0,8	59,1 +/- 3,1		11,3 +/- 0,6	74,2 +/- 2,6	
Met	2,7 +/- 0,1	71,2 +/- 4,0		3,8 +/- 0,1	94,3 +/- 3,3	
Trp	2,0 +/- 0,1	73,1 +/- 6,7		2,4 +/- 0,1	87,5 +/- 2,2	
Phe	3,9 +/- 0,2	61,4 +/- 5,5		5,0 +/- 0,3	74,5 +/- 7,8	
Ile	5,4 +/- 0,3	60,8 +/- 3,3		7,0 +/- 0,5	73,5 +/- 6,9	
Orn	135,7 +/- 3,3	83,1 +/- 1,3		172,7 +/- 6,8	85,5 +/- 2,4	
Leu	8,4 +/- 0,7	69,7 +/- 2,3		11,3 +/- 0,9	81,2 +/- 4,0	
Lys	25,6 +/- 1,6	85,9 +/- 1,3		45,8 +/- 1,7	89,3 +/- 1,7	
Pro	1,7 +/- 0,2	48,4 +/- 7,8		11,7 +/- 1,1	84,0 +/- 1,5	
<b>Gesamt</b>	<b>520,7 +/- 14,3</b>	<b>68,4 +/- 1,1</b>		<b>624,9 +/- 26,8</b>	<b>77,0 +/- 4,9</b>	
Aminosäure	Diauxischer <i>shift</i> (OD <sub>600</sub> = 6,5)			Stationäre Phase (OD <sub>600</sub> = 13,4)		
	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär	
Asp	25,1 +/- 2,3	93,6 +/- 1,9		8,8 +/- 3,2	83,4 +/- 2,1	
Glu	202,5 +/- 11,4	96,5 +/- 1,2		42,5 +/- 3,4	94,7 +/- 1,7	
Asn	18,1 +/- 2,0	85,7 +/- 4,4		7,4 +/- 0,7	75,8 +/- 9,3	
Ser	25,7 +/- 3,0	79,1 +/- 3,2		13,4 +/- 5,9	70,8 +/- 6,0	
Gln	149,2 +/- 9,7	91,9 +/- 3,6		24,2 +/- 2,7	81,3 +/- 6,5	
His	20,1 +/- 1,8	93,7 +/- 2,4		8,8 +/- 0,5	88,9 +/- 1,0	
Gly	20,6 +/- 2,8	74,2 +/- 4,8		9,6 +/- 4,6	70,9 +/- 4,6	
Thr	19,3 +/- 2,2	83,8 +/- 3,5		6,1 +/- 1,2	74,7 +/- 3,5	
Cit	1,7 +/- 0,1	83,4 +/- 4,7		9,9 +/- 15,2	88,9 +/- 1,2	
Ala	38,9 +/- 4,3	69,1 +/- 7,6		15,2 +/- 7,7	98,2 +/- 1,0	
Arg	182,1 +/- 16,2	94,4 +/- 2,6		166,8 +/- 3,3	73,6 +/- 5,7	
Tyr	10,1 +/- 1,3	90,6 +/- 1,8		5,3 +/- 0,5	86,6 +/- 2,3	
Val	19,6 +/- 2,6	90,4 +/- 2,2		6,7 +/- 1,2	83,4 +/- 4,2	
Met	3,9 +/- 0,5	76,8 +/- 1,9		1,7 +/- 0,2	74,2 +/- 3,8	
Trp	2,1 +/- 0,2	84,5 +/- 3,3		1,1 +/- 0,1	69,3 +/- 5,5	
Phe	6,7 +/- 1,0	81,7 +/- 1,7		3,3 +/- 0,6	75,8 +/- 4,1	
Ile	15,5 +/- 1,9	87,2 +/- 2,2		4,8 +/- 0,7	78,6 +/- 4,4	
Orn	109,2 +/- 3,4	91,1 +/- 1,9		9,2 +/- 1,9	74,4 +/- 13,4	
Leu	16,1 +/- 2,3	87,3 +/- 2,1		5,5 +/- 1,1	81,5 +/- 2,6	
Lys	87,4 +/- 7,4	93,8 +/- 2,0		17,5 +/- 0,7	91,5 +/- 4,5	
Pro	13,8 +/- 1,3	70,0 +/- 1,9		2,3 +/- 1,4	9,3 +/- 1,7	
<b>Gesamt</b>	<b>987,6 +/- 70,8</b>	<b>90,9 +/- 2,5</b>		<b>370 +/- 39,9</b>	<b>87,9 +/- 2,0</b>	

Es wurde eine starke Abhängigkeit des Aminosäuregehalts von der Wachstumsphase gefunden. Der Gesamtgehalt stieg ab der frühen exponentiellen Phase an und zeigte im Bereich des diauxischen *shifts* ein Maximum. Die Gesamtaminosäurekonzentration war in dieser Wachstumsphase etwa 50 % höher als in Zellen der frühen bis mittleren exponentiellen Phase, wobei alle Aminosäuren deutlich höher konzentriert waren. Interessant ist die Verschiebung des Arginin-Ornithin-Verhältnisses in Richtung Ornithin von der frühen zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase, wobei die Summe der Konzentrationen dieser beiden Hauptspeicheraminosäuren nahezu konstant blieb. Dieses Verhältnis kehrte sich im diauxischen Bereich des Wachstums wieder um, in der stationären Phase war nur noch sehr wenig Ornithin meßbar. Ähnlich verhielt sich das Verhältnis von Asparagin zu Aspartat und Glutamin zu Glutamat: In der exponentiellen Wachstumsphase überwogen die freien Säuren, ab der diauxischen Phase war ein deutlich größerer Anteil der Säureamide vorhanden. Das Gesamtstickstoffäquivalent in Aminosäuren war während des exponentiellen Wachstums konstant und nahm während des diauxischen *shifts* um etwa 70 % zu. In stationären Kulturen war ein großer Teil der Aminosäurereserven abgebaut, vor allem metabolisch zentrale Spezies wie Alanin und Glutaminsäure waren 2-3-fach reduziert. Als vakuolärer Speicher blieb in der stationären Phase vor allem eine hohe Argininkonzentration erhalten, Lysin war etwa 3-fach geringer konzentriert als in der exponentiellen Phase. Der Gesamtstickstoffgehalt war im Vergleich zur exponentiellen Phase um etwa 15 % verringert.

Der sehr hohe Ornithingehalt der Zellen wurde nur in Natriumsuccinat gepuffertem Medium beobachtet und spezifisch durch die Erhöhung der Natriumkonzentration bewirkt (siehe auch 3.5). Dieser Effekt war in ungepufferten Kulturen nicht zu beobachten (siehe 3.1). In Abbildung 20 ist anhand eines Vergleichs dreier unterschiedlich gepufferter Wachstumsmedien der spezifische Effekt des Natriums gezeigt. Eine metabolische Verwertung des Succinats konnte durch Messung dessen Konzentration im Medium mit RP-Ionenpaar-HPLC ausgeschlossen werden (Abbildung 19 A.). Der Natriumeffekt wurde im K26-Wildtypstamm (CEN.PK-113) nicht gemessen. Dieser Stamm hatte einen etwa 30 % geringeren Gesamtaminosäuregehalt als *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, was dem Aminosäuregehalt des Wildtyps 23344c auf ungepuffertem Medium entsprach.



**Abbildung 20** Abhängigkeit des zellulären Aminosäuregehalts vom Puffer beim Wildtypstamm 23344c, bestimmt durch RP-HPLC. Exponentiell wachsende Kulturen ( $OD_{600} = 1,5-2$ ) des Wildtyps 23344c Natrium-Kaliumphthalatpuffer enthielt, wie Natriumsuccinat-gepuffertes Medium etwa  $0,3 \text{ M Na}^+$ .

Glutamat und Aspartat wurden, wie schon in 3.1 beschrieben, im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten (Messenguy 1980, Kitamoto *et al.* 1988) zu etwa 70-80 % in der Vakuole bestimmt. Beim Glutamat wurde neben dem metabolischen Abbau auch keine Sättigungskinetik der Freisetzung beobachtet, so daß die hier bestimmten Verteilungen unsicher sind (siehe 3.1.2, 3.5). Auch für die Säureamide Asparagin und Glutamin konnten die publizierten Daten nicht reproduziert werden, denen zufolge diese hauptsächlich vakuolär lokalisiert sind.

Während des Anstiegs der internen Aminosäurekonzentration im Bereich des diauxischen *shifts* war eine vermehrte Speicherung in der Vakuole zu erkennen. Der cytosolische Gehalt aller Aminosäuren war während des exponentiellen Wachstums konstant, der cytosolische Arginingehalt war in der frühen exponentiellen Phase erhöht. Ab dem diauxischen *shift* trat eine Verschiebung aller Aminosäuren in die Vakuole auf, was zu einer Zunahme des vakuolären Volumens (Asami und Yonezawa 1995) führen könnte. Der cytosolische Aminosäuregehalt nahm in dieser Wachstumsphase um etwa 40 % ab. In der stationären Phase war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt, nur etwa 30 % des cytoplasmatischen Gehalts exponentiell wachsender Zellen wurden bestimmt. Allerdings ist durch die Unsicherheit bei der Bestimmung der Aspartat- und Glutamatverteilung in der stationären Phase (siehe Abbildung 13) die Berechnung der cytosolischen Gesamtgehalte relativ ungenau.

### 3.3.2 Shift-Experimente

Um die *in vivo*-Dynamik der Aminosäurekompartimentierung zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende Kulturen bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,5 auf Hungermedium ohne Stickstoffquelle oder mit 10 mM L-Prolin als einzige Stickstoffquelle überführt. Es wurden in definierten Zeitabständen Proben genommen und die Aminosäureverteilung durch selektive Nystatinpermeabilisierung und RP-HPLC bestimmt. Prolin ist für *Saccharomyces cerevisiae* eine schlecht verwertbare Stickstoffquelle, die zu einer deutlichen Erniedrigung der Teilungsrate führt (Cooper 1982). Deshalb wurde für beide *downshift*-Experimente eine Mobilisierung der intrazellulären Speicher erwartet. In Tabelle 11 ist zunächst der Effekt nach Adaptation (acht Stunden) an die Mangelbedingungen dokumentiert. Dabei ist zu beachten, dass auf Medium ohne Stickstoffquelle keine Zunahme der Biotrockenmasse und keine Teilungsaktivität mehr erkennbar war (siehe auch Cooper 1982).

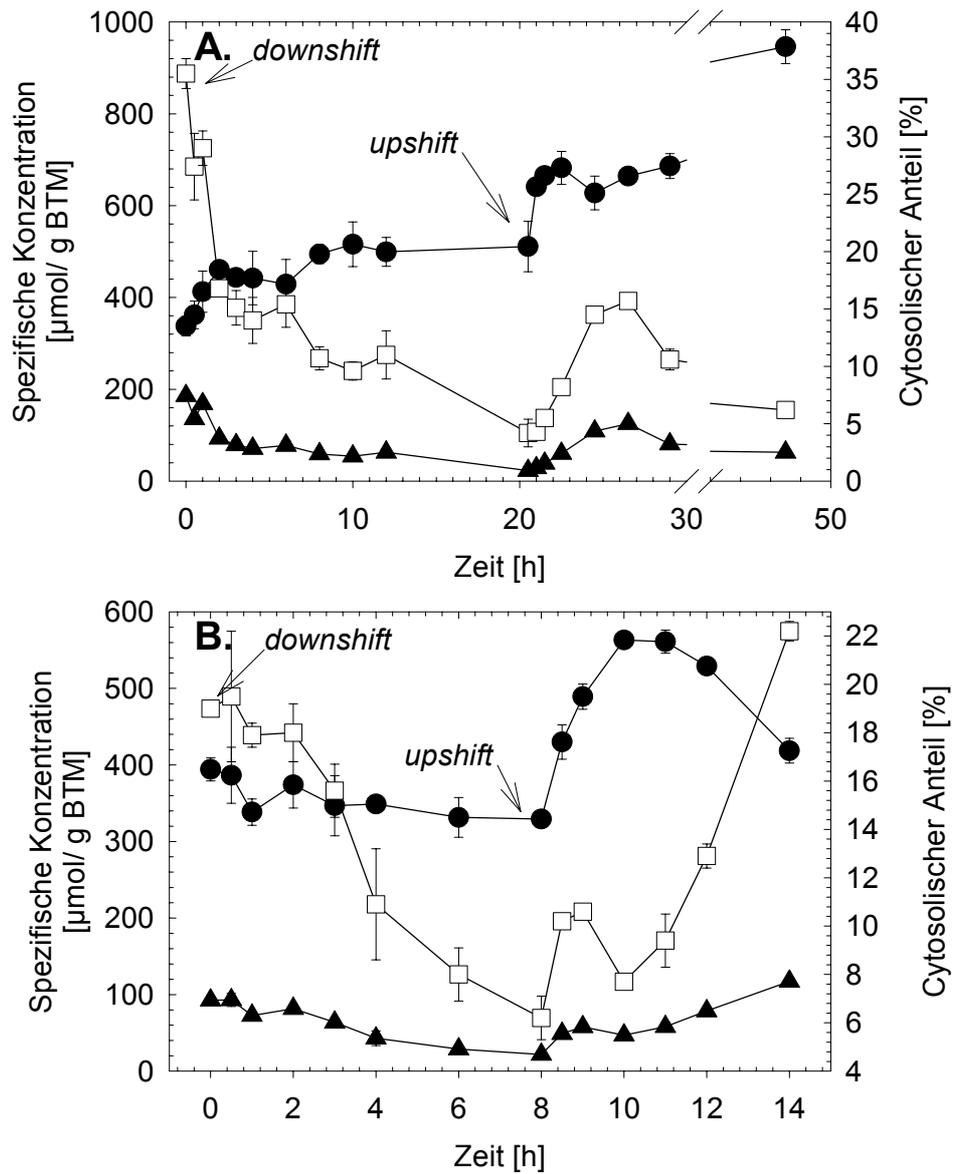
**Tabelle 11** Aminosäureverteilung nach acht Stunden Wachstum auf 10 mM L-Prolin bzw. ohne Stickstoffquelle. *S. cerevisiae* 23344c, CBSS-Medium.

Aminosäure	10 mM L-Prolin			ohne Stickstoff		
	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	% vakuolär	
<b>Asp</b>	14,6 +/- 0,5	89,0	+/- 2,4	12,9 +/- 0,1	90,9	+/- 0,9
<b>Glu</b>	106,8 +/- 5,5	94,9	+/- 0,7	73,5 +/- 0,5	97,5	+/- 0,5
<b>Asn</b>	6,2 +/- 0,4	71,2	+/- 1,6	5,3 +/- 0,3	90,0	+/- 1,3
<b>Ser</b>	11,5 +/- 1,0	67,1	+/- 1,8	15,1 +/- 0,8	81,9	+/- 1,5
<b>Gln</b>	17,5 +/- 1,2	64,9	+/- 1,2	6,7 +/- 0,3	90,3	+/- 1,2
<b>His</b>	5,5 +/- 0,2	86,5	+/- 0,5	4,6 +/- 0,0	88,6	+/- 0,7
<b>Gly</b>	10,3 +/- 0,7	54,3	+/- 3,1	13,5 +/- 0,5	79,8	+/- 1,1
<b>Thr</b>	7,6 +/- 0,6	71,7	+/- 1,5	6,5 +/- 0,2	86,0	+/- 1,4
<b>Cit</b>	0,8 +/- 0,1	76,7	+/- 5,0	0,9 +/- 0,0	74,6	+/- 4,8
<b>Ala</b>	15,4 +/- 2,9	70,0	+/- 5,2	9,6 +/- 0,6	82,8	+/- 1,5
<b>Arg</b>	41,3 +/- 1,7	98,1	+/- 0,2	22,8 +/- 0,3	98,2	+/- 0,6
<b>Tyr</b>	8,2 +/- 0,3	92,6	+/- 1,3	5,8 +/- 0,1	93,9	+/- 0,4
<b>Val</b>	5,5 +/- 0,5	78,4	+/- 1,0	5,7 +/- 0,2	90,8	+/- 1,8
<b>Met</b>	1,3 +/- 0,1	85,4	+/- 2,8	1,8 +/- 0,1	86,6	+/- 8,0
<b>Trp</b>	1,4 +/- 0,1	89,6	+/- 2,7	1,2 +/- 0,0	89,5	+/- 4,6
<b>Phe</b>	3,5 +/- 0,3	84,2	+/- 1,8	3,9 +/- 0,3	90,0	+/- 2,3
<b>Ile</b>	4,1 +/- 0,5	83,8	+/- 2,1	4,4 +/- 0,2	89,6	+/- 1,9
<b>Orn</b>	182,7 +/- 12,5	96,5	+/- 0,3	61,9 +/- 0,5	96,2	+/- 1,1
<b>Leu</b>	8,8 +/- 0,8	88,9	+/- 1,5	7,4 +/- 0,3	89,1	+/- 2,4
<b>Lys</b>	58,6 +/- 2,0	95,8	+/- 0,9	67,4 +/- 1,4	98,9	+/- 0,5
<b>Pro</b>	62,2 +/- 18,8	81,9	+/- 10,5	4,1 +/- 0,0	80,0	+/- 3,4
<b>Gesamt</b>	573,9 +/- 12,0	89,3	+/- 1,0	336,8 +/- 2,1	93,8	+/- 0,9

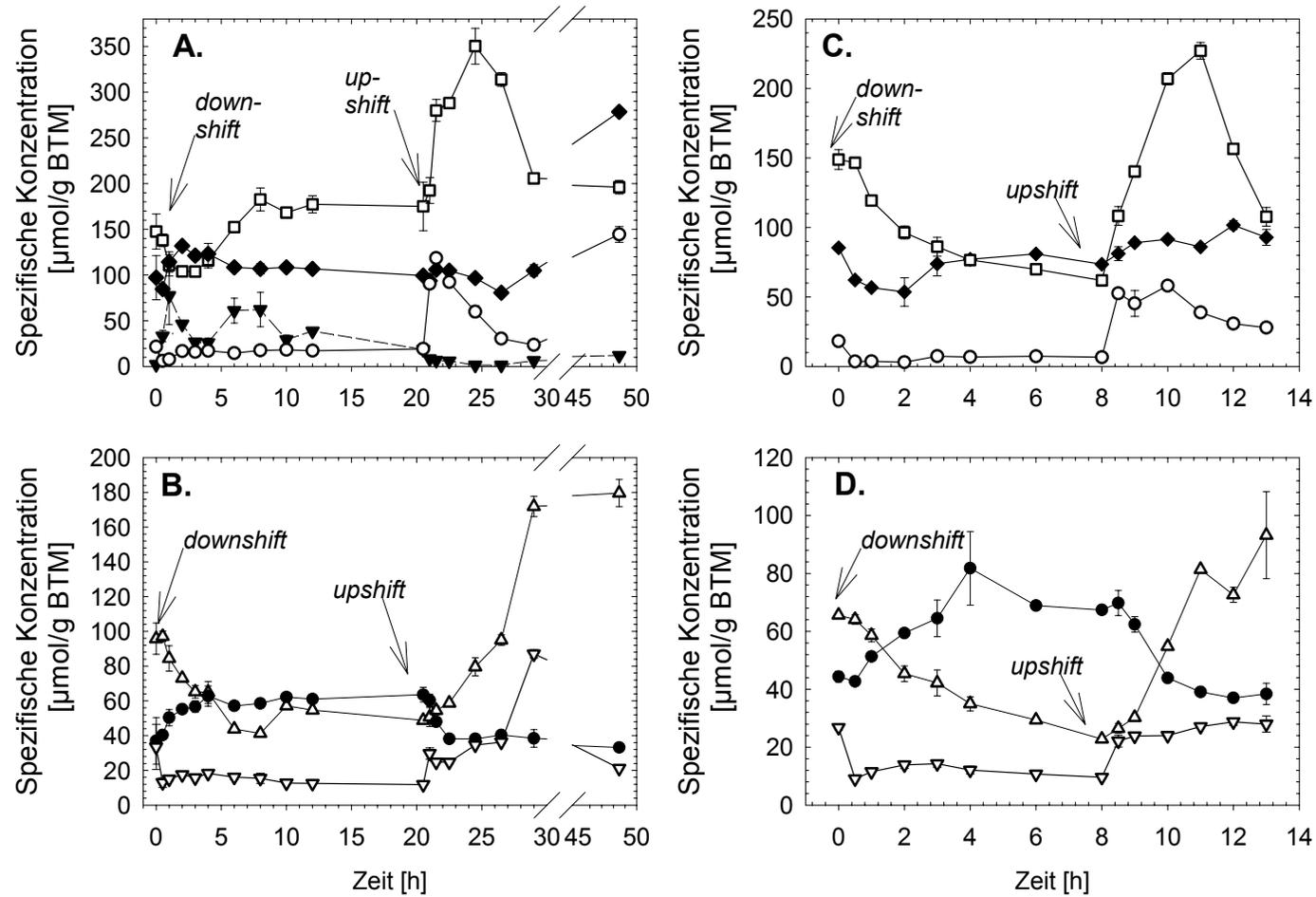
Nach acht Stunden Wachstum auf 10 mM L-Prolin war keine drastische Veränderung des Aminosäuregehalts der Zellen im Vergleich zu exponentiell auf Ammonium wachsenden Kulturen festzustellen, lediglich der zelluläre Prolingehalt stieg etwa 10-fach an, Arginin war

deutlich verringert und die Ornithinkonzentration erhöht. Der Gesamtstickstoffgehalt, berechnet aus den N-Äquivalenten aller Aminosäuren, blieb konstant. Allerdings wurde eine 2 bis 3-fache Abnahme des cytoplasmatischen Anteils aller Aminosäuren beobachtet. Dagegen war nach acht Stunden ohne Stickstoffquelle ein Rückgang des Gesamtaminosäuregehalts auf etwa 65 % der Ausgangskonzentration und ein Rückgang des Gesamtstickstoffs in Aminosäuren um 60 % zu beobachten. Die vakuolären Arginin- und Ornithinreserven sowie Glutamin und Alanin waren am deutlichsten verringert. Überraschend ist, daß der zelluläre Glycin- und Glutaminsäuregehalt nahezu konstant blieben, Lysin sogar um etwa 50 % höher konzentriert war. Alle weiteren Aminosäuren waren geringfügig erniedrigt. Gleichzeitig wurde eine starke Verschiebung aller Aminosäuren in die Vakuole festgestellt (Abbildung 21). Damit konnte deutlich der physiologische Effekt einer schlecht zu metabolisierenden Stickstoffquelle (L-Prolin) von der eines echten Mangelzustands unterschieden werden.

Die dynamische Messung der Aminosäureverteilung zeigte innerhalb der ersten beiden Stunden nach dem Überführen der Kulturen auf Medium mit 10 mM Prolin als Stickstoffquelle eine Verarmung des cytosolischen Aminosäureanteils von etwa 35 % auf 17 % und eine generelle Verlagerung in die Vakuole (Abbildung 21). Diese Tendenz setzte sich fort, bis etwa 10 bis 12 Stunden nach dem Austausch der Stickstoffquelle noch etwa 10 % aller Aminosäuren ohne deutliche Spezifität im Cytoplasma vorhanden waren. Die cytosolische Glutaminkonzentration In Abbildung 22 sind die Gesamtgehalte wichtiger Aminosäuren zeitabhängig dargestellt. Die kompletten Daten dieser Experimente sind im Anhang (6.3) wiedergegeben.



**Abbildung 21** Vakuoläre (●) und cytosolische (▲) Gesamtaminosäuren, sowie cytosolischer Anteil (□) nach *downshift* **A.** auf CBSS-Medium mit 10 mM L-Prolin als einziger Stickstoffquelle, **B.** CBSS-Medium ohne Stickstoffquelle. Beide Experimente wurden mit anschließendem *upshift* auf Standard-CBSS-Medium durchgeführt. Bestimmung durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, Dreifachbestimmung (Fehler = s).



**Abbildung 22** Spezifische zelluläre Konzentration von Orn (□), Glu (◆), Gln (○) Pro (▼), Arg (△), Lys (●) und Ala (▽) nach *downshift* auf **A./ B.** 10 mM L-Prolin, sowie **C./ D.** Medium ohne Stickstoffquelle mit nachfolgendem *upshift* der gehungerten Kulturen auf Standard-CBSS-Medium mit 0,5 % Ammoniumsulfat. Bestimmung durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Nach Überführen der Kulturen auf Medium mit L-Prolin als Stickstoffquelle stieg der zelluläre Prolingehalt innerhalb einer Stunde 20-30-fach und schwankte danach stark (Abbildung 22 A). Dabei war ein deutliches Anzeichen für den aktiven Metabolismus dieser Stickstoffquelle, daß der überwiegende Teil im cytoplasmatischen Extrakt zu finden war (siehe 6.3.1). Die Hauptspeicheramino­säuren Arginin und Ornithin wurden aus der Vakuole mit einer Verzögerung von etwa 30 min bzw. sofort nach dem Überführen mobilisiert. Der Ornithingehalt blieb nach etwa zwei Stunden Mobilisierung konstant und stieg nach vier Stunden Wachstum auf Prolin wieder an. Arginin wurde über 6-7 Stunden auf 40 % der Ausgangskonzentration abgebaut und blieb dann annähernd konstant. Die Konzentration der wichtigsten Aminosäuren im metabolisch aktiven cytosolischen Kompartiment, Glutamin und Alanin, wurden innerhalb von 30 min drastisch verringert und ihre Konzentration pegelte sich nach etwa 2-3 Stunden auf einem etwa zweifach geringeren Niveau ein. Gleichzeitig stiegen der zelluläre Glutamat- und Lysingehalt deutlich an. Die Umstellung des Aminosäurestoffwechsels dauerte etwa 4 Stunden, danach war nur noch ein Anstieg des Ornithingehalts bei einer Mobilisierung von Arginin zu beobachten; alle anderen Aminosäuren blieben bei einer neuen homöostatischen Konzentration nahezu konstant, der Prolingehalt schwankte stark.

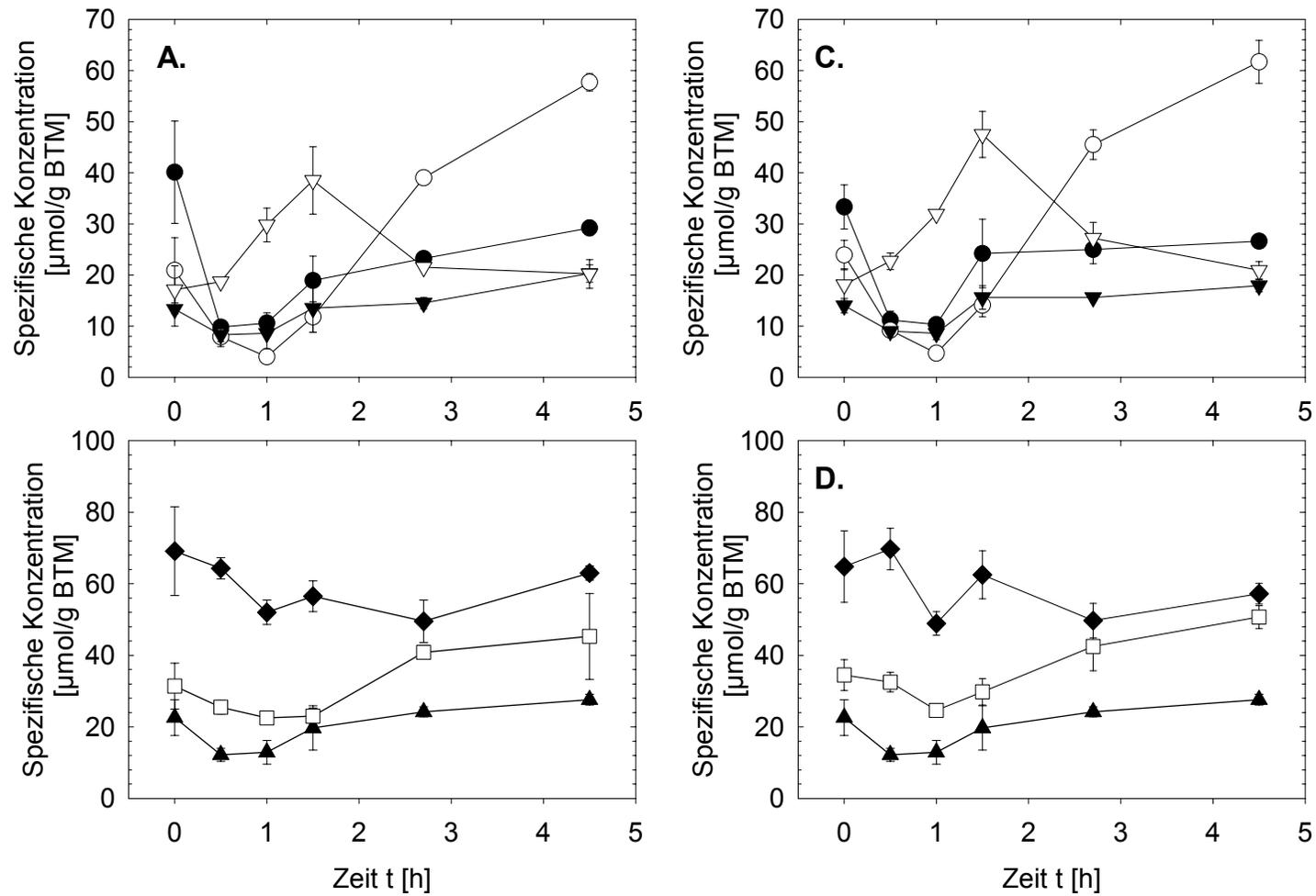
Im Vergleich dazu wurden bei Stickstoffhunger (Abbildung 22 C./ D.) nach etwa 30 min Verzögerung Ornithin und Arginin innerhalb von zwei Stunden auf etwa 65 % ihrer Ausgangskonzentration verringert. Danach verlangsamte sich die Mobilisierung, bis nach acht Stunden noch etwa 35-40 % dieser Speicheramino­säuren übrig waren. Das Stickstoffäquivalent aller Aminosäuren fiel in dieser Zeit auf etwa 40 % des Ausgangswertes. Analog zur Umstellung beim *shift* auf Prolin fielen die Alanin- und Glutaminkonzentration sehr schnell ab, Lysin stieg 50 % an. Glutamin war über die gesamte Hungerperiode 5-fach erniedrigt. Innerhalb der etwa dreistündigen Umstellungsphase war auch die Glutamat- und Aspartatkonzentration vorübergehend erniedrigt. Prolin, Citrullin und Threonin wurden ebenfalls deutlich verringert, waren aber nur in relativ geringer Konzentration vorhanden. Alle anderen Aminosäuren waren nur geringfügig erniedrigt, was auf einen konstanten Umsatz schließen läßt (6.3.2).

Ein Überführen gehungerter Zellen auf frisches Medium mit Ammoniumsulfat führte nach beiden *downshift*-Experimenten zur gleichen Reaktion. Sofort nach Ammoniumgabe stiegen der Glutamin-, Alanin- und Ornithinpool stark an, Lysin hingegen wurde bis auf das ursprüngliche Niveau erniedrigt. Arginin stieg zunächst langsam, nach einer einstündigen Verzögerung stark an. Während der überschießenden Assimilation erreichte der

Gesamtstickstoffgehalt in Aminosäuren einen Wert, der etwa 25 % über dem Kontrollniveau lag, das etwa sechs Stunden nach dem Überimpfen wieder erreicht wurde. Auch der cytosolische Aminosäureanteil erreichte nach sechs Stunden wieder seine homöostatische Konzentration (Abbildung 21 B.). Beim *upshift* der auf Prolin gewachsenen Kulturen wurde dieser Effekt von dem Eintritt in die diauxische Phase überlagert, da bei diesem Experiment die Ausgangszelldichte deutlich höher war ( $OD_{600}=3,4$  beim Überimpfen). Daher stieg der cytoplasmatische Aminosäureanteil nur vorübergehend an (Abbildung 21 A).

### **3.3.3 Dynamische Messungen der Deletionsmutante ME 020**

Der in diesem Stamm deletierte ORF *YMR088c* ist homolog zu entgiftenden Protonen-Antiportern-ähnlichen putativen MFS-Proteinen (Paulsen *et al.* 1998). Das Genprodukt wurde durch GFP-Markierung in der vakuolären Membran lokalisiert, die Stabilität war nicht durch Ammonium beeinflusst. Die Deletionsmutante zeigte eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Canavanin (0,1 µg/ ml). In Stämmen, die mit plasmidcodierten Reportergenkonstrukten (*pCARI-LacZ* oder *pHox1-LacZ*) transformiert waren, wurde eine geringfügig schwächere Induktion des Reportergens durch Harnstoff im Deletionsstamm gefunden. Dagegen war in GFP- bzw. 3xHA-Fusionsstämmen des ORFs *YMR088c* eine starke Induktion durch Harnstoff innerhalb von 90-120 Minuten meßbar. Wurden Zellen, die auf Ammonium als Stickstoffquelle gewachsen waren, auf Harnstoff überführt und [<sup>14</sup>C]-markierte Aminosäuren (0,1 mM) zugesetzt, war eine deutlich stärkere Akkumulation von Radioaktivität aus [<sup>14</sup>C]-L-Arginin, [<sup>14</sup>C]-L-Ornithin und eine geringfügig stärkere Akkumulation aus [<sup>14</sup>C]-L-Glutamin in der Deletionsmutante meßbar (B. André, persönliche Mitteilungen). Es wurde vermutet, daß das Gen für einen vakuolären Aminosäureexporter codiert. Deshalb wurde eine dynamische Bestimmung der Aminosäureverteilung in der Deletionsmutante nach Überführen von Kulturen aus CBSKP-Medium mit 20 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle auf Medium mit 5 mM Harnstoff als Stickstoffquelle über 5 Stunden durchgeführt. In Abbildung 23 sind die Gesamtkonzentrationen wichtiger Aminosäuren nach Überführen auf Harnstoff dargestellt. In 6.3.3 sind alle Gesamtpools zweier unabhängiger dreifachbestimmter Experimente wiedergegeben.



**Abbildung 23** Vakuolärer Gehalt von Glu (●), Gln (○), Gly (▼), Lys (▽), Ala (▲), Arg (◆) und Orn (□) im *Saccharomyces cerevisiae*-Wildtypstamm 23344c (A./ B.) im Vergleich zur Deletionsmutante ME 020 (C./ D.) nach Überführen der Kulturen aus CBSKP-Medium mit 20 mM Ammonium in frisches Medium mit 5 mM Harnstoff ( $t=0$ ,  $OD_{600}=1,2$ ) als Stickstoffquelle. Bestimmung durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Nach Überführen der Kulturen auf CBSKP-Medium mit Harnstoff wurden etwa 20 % des vakuolären Arginins in 2-3 Stunden mobilisiert, die cytosolische Konzentration blieb nahezu konstant. Der vakuoläre Ornithingehalt nahm sogar leicht zu. Glutamin nahm innerhalb der ersten Stunde stark ab und war nach vier Stunden leicht erhöht (siehe 6.3.3), der vakuoläre Anteil war ab drei Stunden nach dem Überführen deutlich erhöht. Alle Aminosäurekonzentrationen waren vorübergehend erniedrigt, pendelten sich aber nach drei Stunden beim ursprünglichen Wert ein. Der Verlauf ist in für die vakuolären Anteile von Glutamat, Alanin und Glycin deutlich zu erkennen. Gleichzeitig war Lysin vorübergehend erhöht. Dieser zeitliche Verlauf ähnelt der Stoffwechsellumstellung bei Überführen der Kulturen von Ammonium auf Prolin als Stickstoffquelle. Innerhalb von etwa drei Stunden stellte sich beim Überführen auf Harnstoff ein neues Gleichgewicht in der Zelle ein. Auf Prolin waren die beobachteten Mobilisierungseffekte stärker ausgeprägt, am Gesamtaminosäuregehalt änderte sich weniger, da große Mengen Prolin in die Zelle aufgenommen wurden (siehe 3.3.2).

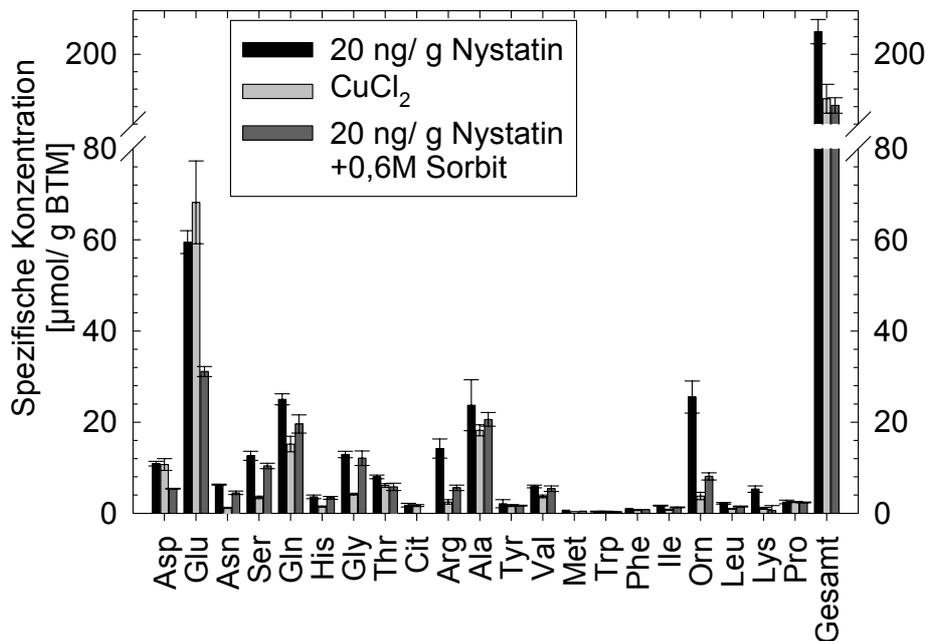
Zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp wurde kein signifikanter Unterschied in zwei unabhängigen Experimenten gefunden.

### **3.4 Abschätzung der mitochondrialen Aminosäurekonzentration**

Da die hier beschriebene Methode zur selektiven Extraktion cytosolischer Metabolite auf einer Komplexbildung des Nystatins mit der ergosterolreichen Plasmamembran beruht, sollte ein Vergleich mit der Kupferchloridmethode nach Ohsumi *et al.* (1988) eine Abschätzung mitochondrialer Metabolitkonzentrationen ermöglichen. In *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass Kupfer die innere mitochondriale Membran permeabilisiert (Keenan und Weiss 1997). Die innere mitochondriale Membran weist aber einen geringen Ergosterolanteil auf (Zinser *et al.* 1991). Dazu wurde ein Vergleich mit der von Dubois und Wiame (1978) beschriebenen Polybasenextraktion durchgeführt, da wichtige Referenzdaten für den Hefestamm  $\Sigma 1278b$  mit dieser Methode bestimmt wurden (Messenguy 1980).

Da bei den bisher beschriebenen Experimenten teilweise relativ hohe Konzentrationen basischer Aminosäuren im cytosolischen Anteil bestimmt wurden, wurde dem Permeabilisierungspuffer 0,6 M Sorbit zur osmotischen Stabilisierung der Vakuolen zugesetzt. Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit der Bestimmung der sauren Aminosäuren wurden nur frische Nystatinstammlösungen verwendet, die nicht länger als 4 Wochen bei -20 °C gelagert wurden.

Abbildung 24 zeigt einen Vergleich der Nystatin- und Kupfermethode. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse, allerdings war bei der Nystatinpermeabilisierung ohne osmotische Stabilisierung eine 2 bis 3-fach erhöhte cytosolische Konzentration der basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin zu beobachten, was auf ein geringfügiges Austreten der vakuolären Aminosäuren hindeutet. Damit waren die bestimmten cytosolischen Gehalte dieser Metabolite etwa deutlich zu hoch. Bei osmotischer Stabilisierung waren die bestimmten cytosolischen Gehalte mit Kupfer und Nystatin nur geringfügig verschieden. Allerdings fiel ein deutlich geringerer Anteil von Aspartat und Glutamat im cytosolischen Extrakt bei Extraktion mit Nystatin auf. Daneben wurden Asparagin, Serin und Glycin mit Nystatin effektiver extrahiert. Mit der Cytochrom c-induzierten Permeabilisierungsmethode wurden keine befriedigenden Ergebnisse erhalten, die direkt bestimmten cytosolischen Konzentrationen waren sehr gering, die basischen Aminosäuren waren im Vergleich zum Nystatin im vakuolären Anteil erniedrigt. Etwa 50-60 % der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat wurden mit dieser Methode in der Vakuole detektiert.



**Abbildung 24** Vergleich der selektiven Extraktion cytosolischer Aminosäuren mit Nystatin (+/- 0,6 M Sorbit) und der Kupferchloridmethode nach Ohsumi *et al.* (1988). Bestimmung durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c auf CBSS-Medium bei OD<sub>600</sub> = 1,8; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Da die Selektivität für einzelne Aminosäuren bei Verwendung von Nystatin im Vergleich zum Kupfer geringfügig verschoben war, ist eine Abschätzung mitochondrialer Gehalte nur schwer möglich. Berechnet man für Aspartat und Glutamat die Differenz beider Methoden

(Kupferchlorid - Nystatin osmotisch stabilisiert), so ergibt sich ein möglicher mitochondrialer Gehalt von etwa 5  $\mu\text{mol/g}$  BTM für Aspartat und 37  $\mu\text{mol/g}$  BTM für Glutamat. Da das mitochondriale Gesamtvolumen etwa 6-7,5 % des zellulären Volumens einnimmt (Visser *et al.* 1995), ergäben sich sehr hohe mitochondriale Konzentrationen von etwa 30 mM (Aspartat) bzw. 250 mM (Glutamat) für die sauren Aminosäuren.

### **3.5 Bestimmung kompatibler Solute**

Eine weitere Anwendung der beschriebenen Nystatinpermeabilisierung war die Messung der subzellulären Verteilung von Aminosäuren und der kompatiblen Solute Glycerol und Trehalose unter verschiedenen Streßbedingungen. Glycerol wird in *Saccharomyces cerevisiae* als wichtigstes kompatibles Solut unter hyperosmolaren Bedingungen synthetisiert (Reed *et al.* 1987), um die intrazelluläre Wasseraktivität zu erniedrigen und einen Verlust des Zellurgors zu verhindern. Für Glycerol wird angenommen, daß es frei über interne Membranen diffundiert (Coury *et al.* 1999). Für das vakuoläre Lumen, das etwa 25 % des Gesamtzellvolumens einnimmt, muß eine Regulation der Wasseraktivität stattfinden, da eine Erniedrigung dieser im Cytoplasma sonst zu einem Schrumpfen der Vakuole durch Wasserausstrom führen würde. Da angenommen wird, daß basische Aminosäuren im vakuolären Lumen an Polyphosphat gebunden und damit osmotisch inaktiv vorliegen (Dürr *et al.* 1979, Booth und Guidotti 1997), wäre auch eine Freisetzung dieser Metabolite regulatorisch und energetisch sinnvoll. Hinweise auf eine Funktion der Vakuole bei der Osmoregulation wurden bisher nur indirekt gefunden (Latterich und Watson 1991, Nass und Rao 1999). Allerdings kann mittels selektiver Extraktion nur eine Aussage über die Glycerolverteilung getroffen werden, wenn eine gehinderte Diffusion über den Tonoplasten vorliegt.

Trehalose wird als generelle Streßantwort, vor allem aber bei Trocken-, Hitze- und oxidativem Streß sowie bei durch Glucose limitiertem Wachstum synthetisiert (Krallish *et al.* 1997, Parrou *et al.* 1999, Argüelles 2000) und besitzt stark kosmotrope Eigenschaften (Hottiger *et al.* 1994, Sola-Penna und Meyer-Fernandes. 1998, Simola *et al.* 2000). Neben der cytosolischen Trehalase, die für den Streßmetabolismus essentiell ist, wurde eine saure Trehalase in Hefevakuolen beschrieben und charakterisiert (Londesborough und Varimo 1984, Mittenbühler und Holzer 1988, Destruelle *et al.* 1995). Keller *et al.* (1982) beschrieben eine Trehaloseakkumulation in cytosolischen Fraktionen und eine Trehalaseaktivität im vakuolären Anteil nach Fraktionierung von Protoplasten durch Dichtegradientenzentrifugation.

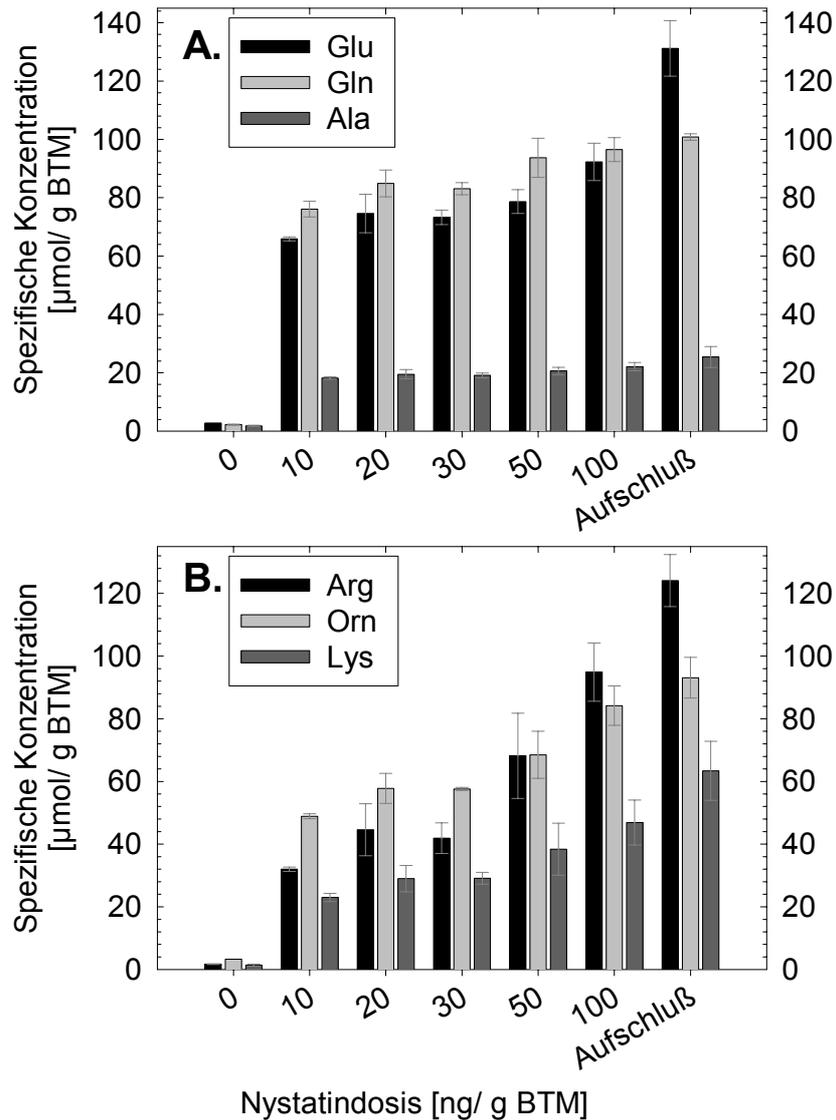
Es sollte die Kompartimentierung der Aminosäuren und der Stressmetabolite unter hyperosmolaren Bedingungen und nach Hitzeschock bestimmt werden. Weiterhin stand eine trehalasefreie Mutante (M. Albertsen) zur Verfügung, mit der ein Einfluß des Trehalosekatabolismus auf die Streßresistenz und die Kompartimentierung bestimmt werden sollte (Nwaka *et al.* 1995, Nwaka *et al.* 1996, Shima *et al.* 1999, Blomberg 2000). Durch Messung der Trehaloseverteilung in dieser Mutante konnte ein Abbau dieses Metaboliten während der selektiven Extraktion ausgeschlossen werden.

### **3.5.1 Wachstum der trehalasefreien Mutante**

Der trehalasefreie Stamm RK 32 zeigte erst ab dem diauxischen *shift* einen Unterschied zum Wildtyp. Das diauxische Wachstum war verlangsamt und es wurde in der stationären Phase eine etwa zwei OD<sub>600</sub>-Einheiten geringere Zelldichte als beim Wildtypstamm erreicht. Auch bei Wachstum auf 0,6 M NaCl wurde dieser Phänotyp beobachtet. Während Hitzestreß (zwei Stunden bei 39 °C) wurde keine erhöhte Sterberate der Zellen im Vergleich zum Wildtyp gefunden.

### **3.5.2 Salzstreß**

Es wurde durch Titrationsexperimente wie in 3.1.1 beschrieben die Selektivität der Extraktion durch Bestimmung der Aminosäuren im Permeabilisat in Abhängigkeit von der Nystatindosis bestimmt. Parallel dazu wurde in allen Extrakten Glycerol und Trehalose mittels GC der TMS-Derivate quantifiziert. Alle Experimente wurden, um Puffereffekte auszuschließen, mit Kulturen in CBSKP-Medium durchgeführt (siehe auch Abbildung 20). Exponentiell wachsende Übernachtskulturen wurden auf eine Endkonzentration von 0,9 M NaCl eingestellt und nach weiteren vier Stunden Wachstum selektiv permeabilisiert.



**Abbildung 25** Permeabilisierungseffizienz für **A.** Glu, Gln und Ala, sowie **B.** Arg, Orn und Lys in Abhängigkeit von der Nystatindosis, bestimmt durch RP-HPLC nach OPA-MPA/FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c auf CBSKP-Medium. Kulturen wurden bei  $\text{OD}_{600}=1,2$  auf 0,9 M NaCl eingestellt und nach 4 h permeabilisiert. Dreifachbestimmung (Fehler = s).

In Abbildung 25 ist anhand der Aminosäurefreisetzung gezeigt, daß Zellen unter hyperosmolaren Bedingungen sensitiver gegen Nystatin waren als unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 8). Schon bei 10 ng Nystatin/g BTM waren cytosolische Aminosäuren quantitativ extrahiert. Anhand der Titrationskurve der basischen Aminosäuren ist zu erkennen, daß die Extraktion bei dieser Nystatindosis selektiv war. Bis etwa 30 ng Nystatin/g BTM blieb die Konzentration der vakuolären Leitmetabolite in den Extrakten fast konstant und stieg erst bei höheren Dosen deutlich an. Für die trehalasefreie

Mutante (RK 32) wurde ein analoger Verlauf beobachtet. In Tabelle 12 sind die Gesamtaminosäuregehalte und deren subzelluläre Verteilung (selektive Nystatindosis 20 ng/ g BTM) angegeben. Der Aminosäuregehalt der Zellen war relativ hoch, vor allem die basischen Aminosäuren Glutamin, Ornithin, Lysin, Citrullin und Histidin waren im Vergleich zu Kontrollbedingungen deutlich erhöht, Alanin war erniedrigt. In der trehalasefreien Mutante war Ornithin 2-fach, Citrullin 2,5-fach und Glutamin 3-fach niedriger konzentriert als im Wildtyp. Insgesamt waren etwa 50 % der Aminosäuren cytosolisch lokalisiert, wobei auch ein relativ hoher Anteil basischer Aminosäuren im Cytoplasma zu finden war. Die Zellen reagierten neben einer Synthese von Glycerol auch durch Anreicherung der Speicheraminosäuren im Cytosol, um eine Erniedrigung der Wasseraktivität im Cytoplasma zu erreichen und den osmotischen Gradienten über die Membranen auszugleichen. Die Erhöhung des zellulären Ornithingehalts bei erhöhter Natriumkonzentration wurde schon bei Pufferung des Mediums mit Natriumsuccinat als adaptiver Effekt beobachtet (siehe 3.3).

Glycerol wurde schon bei 10 ng Nystatin/ g BTM quantitativ (etwa 600  $\mu\text{mol/ g BTM}$ ) im Permeabilisat gefunden. Da die vakuoläre Membran für Glycerol wahrscheinlich frei permeabel ist (Coury *et al.* 1999), kann über die Verteilung zwischen Vakuole und Cytoplasma keine Aussage getroffen werden. Eine Transportmessung radioaktiv markierten Glycerols in vakuoläre Vesikel zeigte keine ATP-abhängige Akkumulation des kompatiblen Solut in der Vakuole (I. Bellahn, persönliche Mitteilung).

Eine Trehaloseakkumulation war unter diesen Bedingungen nicht meßbar.

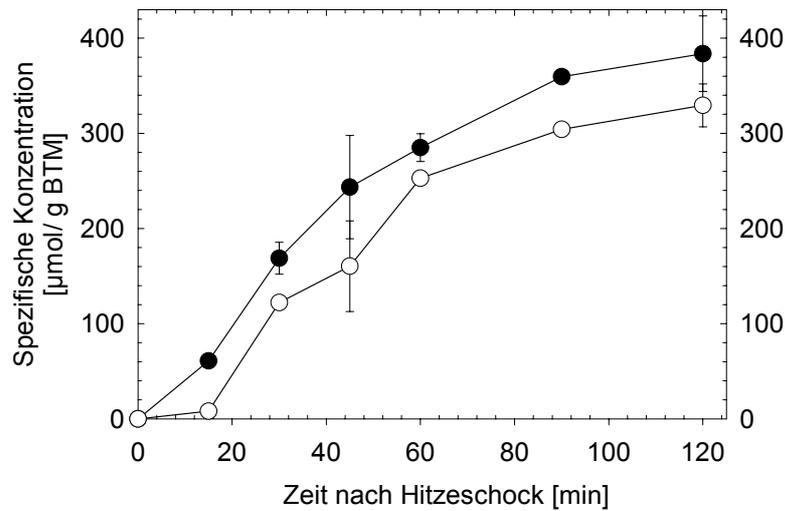
**Tabelle 12** Aminosäuregehalt und -kompartimentierung im Wildtyp 23344c und der trehalasefreien Mutante RK 32 nach vier Stunden Wachstum auf 0,9 M NaCl, OD<sub>600</sub>=2,5-3,0. Bestimmung durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung

Stamm	23344c						RK 32					
Amino-säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	25,1	+/-	1,3	42,4	+/-	1,6	16,8	+/-	0,7	55,1	+/-	6,4
Glu	131,2	+/-	9,5	49,7	+/-	3,1	148,8	+/-	3,3	59,1	+/-	4,0
Asn	6,9	+/-	1,3	23,2	+/-	16,4	7,6	+/-	0,6	47,2	+/-	0,8
Ser	21,1	+/-	2,0	18,5	+/-	9,6	18,4	+/-	2,4	32,9	+/-	0,7
Gln	100,8	+/-	1,1	24,5	+/-	3,4	32,3	+/-	10,3	-34,0	+/-	23,2
His	11,5	+/-	1,1	58,6	+/-	5,0	9,5	+/-	0,6	64,6	+/-	7,2
Gly	13,6	+/-	2,2	18,8	+/-	16,8	21,0	+/-	1,9	44,3	+/-	10,8
Thr	13,1	+/-	1,9	46,1	+/-	10,2	15,1	+/-	0,9	61,0	+/-	7,7
Cit	31,3	+/-	0,8	51,4	+/-	4,5	12,1	+/-	1,2	58,4	+/-	9,4
Ala	25,4	+/-	3,6	27,8	+/-	12,0	29,2	+/-	1,1	37,1	+/-	4,7
Arg	124,1	+/-	8,3	74,2	+/-	1,1	116,5	+/-	9,3	68,4	+/-	5,5
Tyr	4,3	+/-	0,8	60,5	+/-	7,8	6,4	+/-	0,5	70,4	+/-	6,1
Val	9,1	+/-	2,0	39,0	+/-	15,4	12,2	+/-	0,7	40,6	+/-	12,6
Met	2,2	+/-	0,6	38,8	+/-	20,6	2,8	+/-	0,0	73,0	+/-	5,6
Trp	1,1	+/-	0,3	79,9	+/-	4,6	1,5	+/-	0,1	78,0	+/-	3,2
Phe	4,2	+/-	1,1	62,6	+/-	10,1	5,8	+/-	0,3	79,1	+/-	5,0
Ile	6,0	+/-	1,6	56,9	+/-	13,4	8,3	+/-	0,5	76,7	+/-	3,6
Orn	93,1	+/-	6,5	47,3	+/-	4,6	45,1	+/-	2,5	47,3	+/-	5,4
Leu	8,4	+/-	2,4	63,6	+/-	11,6	11,0	+/-	0,3	83,8	+/-	5,2
Lys	63,4	+/-	9,4	63,5	+/-	3,4	75,2	+/-	3,8	61,4	+/-	3,3
Pro	1,5	+/-	0,1	0	+/-	21,4	2,5	+/-	0,4	0	+/-	14,0
<b>Gesamt</b>	<b>697,5</b>	<b>+/-</b>	<b>55,9</b>	<b>48,7</b>	<b>+/-</b>	<b>4,9</b>	<b>598,0</b>	<b>+/-</b>	<b>7,6</b>	<b>53,7</b>	<b>+/-</b>	<b>5,0</b>

### 3.5.3 Hitzeschock

Um eine starke Trehaloseakkumulation zu erreichen, wurden exponentiell wachsende Kulturen (OD<sub>600</sub> = 1,3, Kulturvolumen 70 ml) im Wasserbad einem Hitzeschock bei 39 °C unterworfen. Zur Bestimmung der Trehaloseakkumulation wurden zeitabhängig Proben durch schnelle Probennahme entnommen und die Extrakte durch GC der TMS-Derivate untersucht (Abbildung 26).

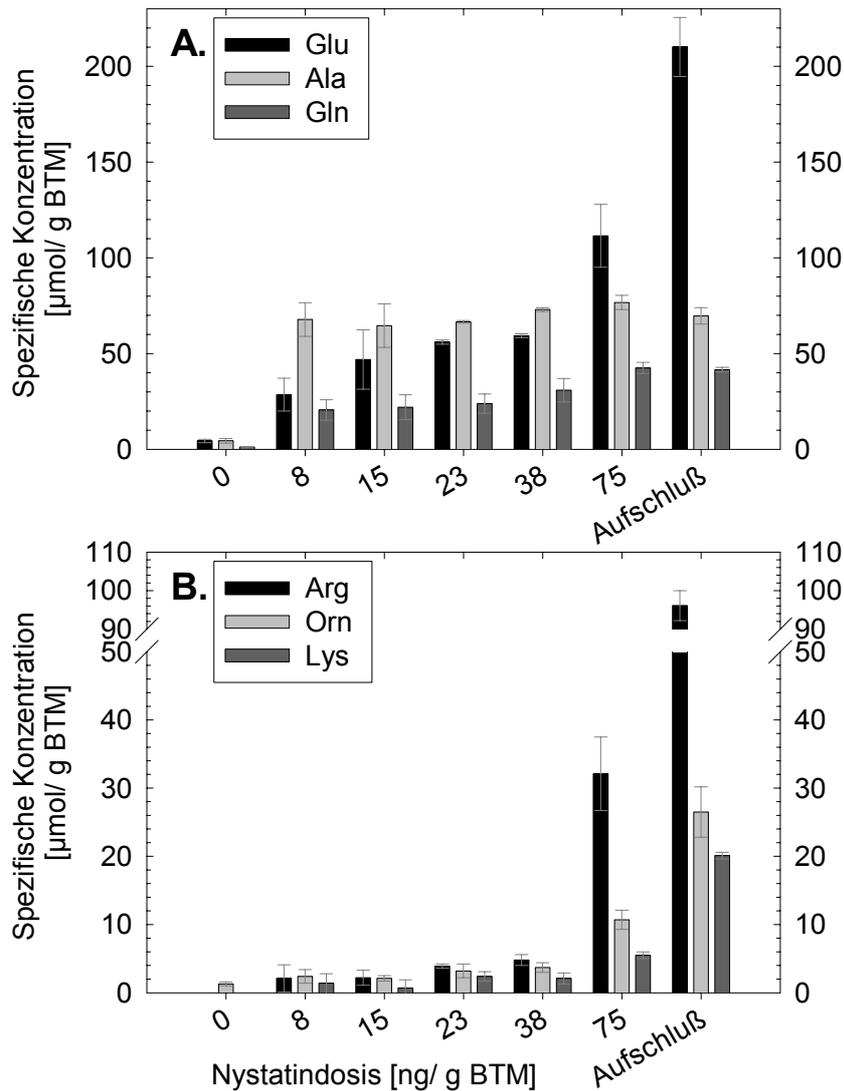
Die Trehaloseakkumulation setzte beim Wildtyp sofort nach dem Hitzeschock ein, nach etwa 15 Minuten wurde eine maximale Rate erreicht, die etwa 30 Minuten konstant blieb. Nach etwa einer Stunde verlangsamte sich die Trehaloseanhäufung und der Gehalt näherte sich nach 2 Stunden Hitzeschock einem Maximum bei etwa 350 µmol Trehalose/ g BTM (etwa 11-12 % (w/ w) der Biotrockenmasse). Bei der Mutante war lediglich das Einsetzen der Trehaloseakkumulation 15 Minuten verzögert.



**Abbildung 26** Kinetik der Trehaloseakkumulation bei 39 °C in Zellen des *Saccharomyces cerevisiae*-Wildtyps 23344c (●) und der trehalasefreien Mutante RK 32 (○) auf CBSKP-Medium, bestimmt durch GC nach TMS-Derivatisierung. Doppelbestimmung (Fehler = s).

Die Bestimmung der Biotrockenmasse und der Zellzahl in hitzegeschockten Kulturen ergab eine starke Zunahme der Biotrockenmasse während zwei Stunden Hitzeschock bei konstanter Zellzahl. Die Lichtstreuung der Kulturen ( $OD_{600}$ ) war trotz konstanter Zellzahl nach dem Hitzeschock deutlich erhöht, was auf eine Volumenzunahme der Zellen hindeutete. Der Anteil überlebender Zellen nach zwei Stunden Hitzeschock lag bei etwa 60 % für die trehalasefreie Mutante und den Wildtypstamm.

Zur Überprüfung der Selektivität der Extraktion niedermolekularer Metabolite mit Nystatin unter diesen Bedingungen wurde ein Titrationsexperiment mit steigender Nystatindosis durchgeführt und die Aminosäuren als Leitmetabolite in den Extrakten bestimmt (Abbildung 29). Die beobachtete Selektivität war für Deletionsmutante und Wildtyp identisch.



**Abbildung 27** Abhängigkeit der Konzentration **A.** vorwiegend cytosolischer (Glu, Ala, Gln) und **B.** vakuolärer (Lys, Arg, Orn) Aminosäuren im Zellpermeabilisat von der Nystatindosis, bestimmt mit RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c, 60 min 39 °C auf CBSKP-Medium (20 ml Kulturvolumen) bei  $OD_{600} = 2,5-3,0$ ; Dreifachbestimmung (Fehler = s).

Es wurde auch nach Hitzeschock eine für die Permeabilisierung der Plasmamembran selektive Nystatindosis von etwa 10-20 ng/ g BTM gefunden. Der dynamische Bereich der Methode war im Vergleich zu Standardbedingungen zu höherer Nystatindosis verschoben, wobei ein sehr geringes Austreten vakuolärer Aminosäuren bei etwa 25-30 ng/ g BTM in Abbildung 27 zu vermuten ist. Im Vergleich zu exponentiell wachsenden Kulturen bei 30 °C waren Glutamat, Arginin und Alanin im Wildtyp nach Hitzeschock deutlich erhöht, Serin und Ornithin leicht erniedrigt. In der trehalasefreien Mutante dagegen war Glutamin 75 % geringer konzentriert und Arginin im Vergleich zum Kontrolllevel leicht erniedrigt. Auffällig

ist, daß Serin und Glycin ausschließlich im cytosolischen Anteil zu finden waren, dagegen über 90 % der basischen Aminosäuren in der Vakuole bestimmt wurden.

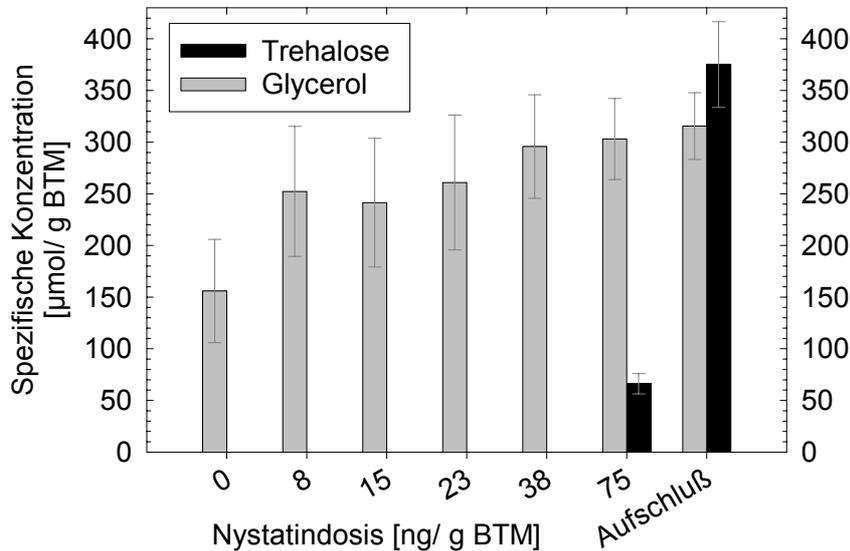
**Tabelle 13** Aminosäuregehalt und zelluläre Lokalisation der Aminosäuren nach einer Stunde Hitzeschock (39 °C) im Wildtyp 23344c und der trehalasefreien Mutante RK 32, bestimmt durch RP-HPLC nach OPA-MPA/ FmocCl-Derivatisierung

Stamm	23344c					RK 32						
	Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	26,6	+/-	0,3	79,7	+/-	6,1	36,2	+/-	3,2	80,9	+/-	1,7
Glu	210,1	+/-	15,4	77,9	+/-	6,7	199,3	+/-	12,0	76,8	+/-	2,4
Asn	8,5	+/-	0,1	25,9	+/-	14,1	5,3	+/-	0,9	11,7	+/-	12,6
Ser	16,2	+/-	0,8	1,9	+/-	3,3	12,1	+/-	0,3	0,0	+/-	0,0
Gln	41,6	+/-	1,2	47,5	+/-	14,3	9,8	+/-	0,4	1,9	+/-	3,4
His	11,4	+/-	0,6	83,9	+/-	3,6	9,8	+/-	0,5	80,4	+/-	5,8
Gly	18,9	+/-	2,0	0,0	+/-	0,0	17,3	+/-	0,3	0,0	+/-	0,0
Thr	16,6	+/-	0,6	47,1	+/-	2,5	13,4	+/-	0,6	38,7	+/-	10,7
Cit	5,6	+/-	1,1	78,5	+/-	2,3	2,1	+/-	0,1	100,0	+/-	0,0
Arg	96,1	+/-	3,9	97,7	+/-	1,1	65,6	+/-	1,3	95,0	+/-	1,2
Ala	69,7	+/-	4,3	8,7	+/-	12,3	65,0	+/-	3,6	3,6	+/-	6,2
Tyr	2,0	+/-	0,1	47,1	+/-	14,3	2,8	+/-	0,3	71,8	+/-	7,6
Val	9,0	+/-	0,5	47,1	+/-	9,9	9,0	+/-	0,7	49,5	+/-	7,8
Met	1,4	+/-	0,0	30,9	+/-	18,2	1,4	+/-	0,2	56,9	+/-	10,3
Trp	0,4	+/-	0,0	10,5	+/-	11,9	0,6	+/-	0,1	100,0	+/-	0,0
Phe	1,6	+/-	0,1	45,0	+/-	10,1	2,3	+/-	0,3	69,4	+/-	8,4
Ile	3,2	+/-	0,3	49,0	+/-	13,3	4,1	+/-	0,6	63,5	+/-	10,6
Orn	26,5	+/-	3,7	91,8	+/-	2,8	22,6	+/-	2,7	79,4	+/-	6,0
Leu	3,9	+/-	0,3	62,4	+/-	9,7	4,6	+/-	0,7	73,5	+/-	6,7
Lys	20,1	+/-	0,5	96,7	+/-	5,8	23,3	+/-	0,4	92,1	+/-	1,5
Pro	3,1	+/-	0,4	0,0	+/-	0,0	2,7	+/-	0,1	0,0	+/-	0,0
<b>Gesamt</b>	<b>592,5</b>	<b>+/-</b>	<b>27,2</b>	<b>64,0</b>	<b>+/-</b>	<b>6,7</b>	<b>509,1</b>	<b>+/-</b>	<b>15,3</b>	<b>60,0</b>	<b>+/-</b>	<b>3,9</b>

In Abbildung 28 ist ein Dosis-Wirkungsexperiment mit Nystatin für die Glycerol- und Trehalosefreisetzung aus Zellen des Wildtyps nach Hitzeschock gezeigt. Glycerol war bei 8 ng/ g BTM Nystatin quantitativ im Permeabilisat zu finden. Trehalose dagegen konnte selbst mit 75 ng Nystatin / g BTM + 10 % DMSO nur zu etwa 15 % freigesetzt werden. Allerdings betrug die Wiederfindung der Trehalose im vakuolären und cytosolischen Extrakt im Vergleich zum Zellaufschluß nur etwa 50 %. In der trehalasefreien Mutante wurde ein analoges Ergebnis gefunden. Es ist fraglich, ob Trehalose in innere Kompartimente transportiert wird oder eine gehinderte Diffusion durch die mit Nystatin gebildeten Porenkomplexe vorlag.

Zur Kontrolle dieser Experimente wurde die selektive Permeabilisierung nach Ohsumi *et al.* (1988) mit Kupferchlorid und GC-Analyse der TMS-Derivate durchgeführt. Im Wildtyp konnten etwa 50 % der Gesamttrehalose mit Kupferchlorid freigesetzt werden, in der

trehalasefreien Mutante nur 25 %. Allerdings wurden auch bei diesem Experiment in den vakuolären Extrakten nur etwa 50 % der verbleibenden Trehalose wiedergefunden.



**Abbildung 28** Glycerol und Trehalose im Permeabilisat in Abhängigkeit von der Nystatindosis, bestimmt durch GC der TMS-Derivate. *Saccharomyces cerevisiae* 23344c in CBSKP-Medium nach 60 min bei 39 °C, OD<sub>600</sub> = 2,8; Dreifachbestimmung (Fehler = sd).

### 3.5.4 Isolierung intakter Vakuolen

Zur Kontrolle der Ergebnisse der selektiven Extraktionsexperimente wurden intakte Vakuolen isoliert, um den Gehalt an Aminosäuren und kompatiblen Soluten nach Hitzeschock zu bestimmen. Da die Protoplastenlyse mit DEAE-Dextran weitgehend selektiv die cytoplasmatische Membran zerstört (Dürr *et al.* 1975), konnte schon vor der Dichtegradientenzentrifugation im Überstand des Lysats der cytosolische Gehalt der Metabolite sehr gut abgeschätzt werden. In Tabelle 14 ist die Bestimmung der Aminosäuren in allen Fraktionen und Zwischenstufen der Isolierung wiedergegeben. Auffällig war der starke Rückgang der Gesamtaminosäuren während der Protoplastierung der Zellen, der teilweise auf ein Lysieren der Protoplasten und durch Verluste beim Abzentrifugieren zurückzuführen war. Der metabolische Verlust während der 30-minütigen Inkubation ist durch einen Rückgang der zentralen Metabolite Glutaminsäure und Alanin um etwa 80 % erkennbar. Typisch vakuoläre Aminosäuren wie Arginin waren 2-3-fach verringert. Nach der Lyse mit 100 µg/ ml DEAE-Dextran bei einer Zelldichte von 10<sup>8</sup> Zellen/ ml war eine starke Anreicherung der basischen Aminosäuren im Pellet des Lysats (Rohvakuolen) meßbar, Aspartat, Glutamat, Alanin und Valin waren im Überstand angereichert. Diese

Beobachtungen weisen in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Messenguy 1980, Kitamoto *et al.* 1988) auf eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation dieser Metabolite hin. Asparagin, Serin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin waren fast gleich verteilt. In den Fraktionen des Dichtegradienten waren etwa 40 % aller Aminosäuren in der auf 2,5 % Ficoll flotierenden Fraktion angereichert. Daneben war noch ein sehr großer Teil aller Aminosäuren im Pellet des Gradienten zu finden, was auf nicht vollständig protoplastierte Zellen hindeutet, deren Plasmamembran aber bei der DEAE-Dextran-induzierten Lyse permeabilisiert worden war. Durch die Analyse der Aminosäureverteilung in den Zellfraktionen wurde eine teilweise deutlich andere Verteilung der Aminosäuren als bei selektiver Extraktion mit Nystatin bestimmt. Die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat konnten mit Nystatin nicht reproduzierbar selektiv extrahiert werden, waren aber nach den Ergebnissen der Zellfraktionierung in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Messenguy 1980, Kitamoto *et al.* 1988) vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Allerdings kann wegen der ausgeprägten metabolischen Veränderungen beim Verdau der Zellwand nur ein begrenzter Vergleich zu den mit Nystatin bestimmten Verteilungen angestellt werden.

Eine quantitative Bestimmung des Trehalosegehalts der Fraktionen mittels GC war schwierig, da in allen Fraktionen die hohe Sorbitkonzentration die Analyse störte. Trotzdem konnte ein Verlust von etwa 80 % des Gesamttrehalosegehalts im Wildtyp und der trehalasefreien Mutante, korrelierend mit dem Rückgang der Glutaminsäurekonzentration, abgeschätzt werden. Im Rohvakuolenpellet konnte nur bei der trehalasefreien Mutante ein sehr geringer Trehalosegehalt gemessen werden. Eine Analyse der Gradientenfraktionen war durch die hohe Sorbit- und Saccharosekonzentration nicht möglich.

-Ergebnisse-

**Tabelle 14** Aminosäuregehalte der Zellfraktionen, bestimmt durch RP-HPLC nach OPA-MPA/FmocCl-Derivatisierung. Trehalasefreier Deletionsstamm *Saccharomyces cerevisiae* RK 32 nach 90 min Hitzeschock bei 39 °C in CBSKP-Medium bei OD<sub>600</sub> = 2,9.

Fraktion	Aliquots				Fraktion Nr.**					
	Zellen	Proto- plasten	Überstand nach Lyse	Pellet nach Lyse	1	2	3	4	5	6
Aminosäure	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol/ g BTM}$ ]*									
<b>Asp</b>	38,1	5,0	3,8	1,6	0,1	0,0	0,5	0,1	0,0	0,1
<b>Glu</b>	222,6	49,4	35,8	9,8	0,5	0,1	4,7	1,0	0,1	1,0
<b>Asn</b>	6,8	2,2	1,6	1,3	0,1	0,0	0,7	0,1	0,0	1,5
<b>Ser</b>	12,7	2,0	1,5	1,4	0,1	0,0	0,8	0,1	0,0	1,7
<b>Gln</b>	13,2	3,5	1,5	2,5	0,1	0,0	0,7	0,1	0,0	2,3
<b>His</b>	13,9	5,6	1,3	4,0	0,1	0,0	2,2	0,2	0,0	3,5
<b>Gly</b>	27,1	3,4	1,3	2,0	0,1	0,0	1,3	0,1	0,0	2,2
<b>Thr</b>	19,7	2,8	1,4	1,6	0,1	0,0	1,0	0,1	0,0	1,8
<b>Cit</b>	2,5	2,6	0,8	1,7	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	1,8
<b>Ala</b>	93,6	19,7	10,7	7,5	0,4	0,0	1,1	0,5	0,0	0,0
<b>Arg</b>	57,2	24,1	3,7	17,4	0,3	0,0	3,3	0,5	0,0	8,3
<b>Tyr</b>	2,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,1	0,0	0,5
<b>Val</b>	12,7	8,3	5,3	3,1	0,2	0,0	1,5	0,3	0,0	2,3
<b>Met</b>	1,3	0,4	0,3	0,3	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4
<b>Trp</b>	0,4	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
<b>Phe</b>	3,1	0,7	0,5	0,6	0,1	0,0	0,4	0,1	0,0	0,7
<b>Ile</b>	4,5	1,7	1,0	1,1	0,1	0,0	0,6	0,1	0,0	1,1
<b>Orn</b>	10,8	5,2	0,5	3,4	0,0	0,0	3,1	0,1	0,0	9,2
<b>Leu</b>	4,4	1,9	1,1	1,4	0,1	0,0	1,1	0,1	0,0	1,6
<b>Lys</b>	12,5	3,4	0,2	2,3	0,1	0,0	5,0	0,1	0,0	7,2
<b>Pro</b>	3,4	0,9	0,4	0,7	1,7	2,8	0,5	2,5	2,9	1,0
<b>Gesamt</b>	562,8	142,9	72,7	63,8	4,2	3,2	29,3	6,4	3,4	48,3

\*Die spezifische Konzentration wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die Gesamtmenge der eingesetzten Zellen zurückgerechnet.

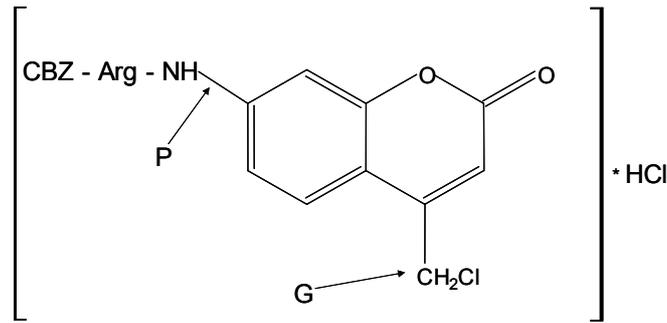
\*\*Die Numerierung der Fraktionen ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt

## **4 Diskussion**

### **4.1 Etablierung einer Methode zur selektiven Metabolitextraktion**

Ein Ansatz zur *in vivo*-Charakterisierung vakuolärer Transportprozesse ist die Analyse subzellulärer Metabolitverteilungen. Da die in der Literatur beschriebenen Methoden zur selektiven Extraktion der cytosolischen Metabolite aus *Saccharomyces cerevisiae* (Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988) mechanistisch nicht geklärt sind, wurde in dieser Arbeit eine neue Routinemethode zur differentiellen Extraktion niedermolekularer Metabolite mittels des Polyenantibiotikums Nystatin entwickelt. Der Wirkmechanismus von Nystatin ist gut untersucht (Bolard 1986). Avéret *et al.* (1998) und Larsson *et al.* (2000) konnten das Polyenantibiotikum zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von Hefeprotoplasten verwenden, um *in situ*-Studien des Zellstoffwechsels durchzuführen.

Die Selektivität der Nystatinextraktion konnte durch die dosisabhängige Permeabilisierungswirkung für Aminosäuren gezeigt werden. Bei einer selektiven Dosis von 20 ng Nystatin/g BTM wurde, wie in der Literatur beschrieben, eine starke Anreicherung basischer Aminosäuren im vakuolären Anteil gefunden (Wiemken und Dürr 1974, Messenguy *et al.* 1980, Kitamoto *et al.* 1988). Die Intaktheit der vakuolären Membran wurde weiterhin durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt. Die Entfärbung des vakuolären Lumens nach der Nystatinbehandlung trotz morphologisch intakter Vakuolen (Abbildung 15) könnte auf einen pH-Anstieg im vakuolären Lumen durch die Deenergetisierung permeabilisierter Zellen zurückzuführen sein. Bei der Analyse der Adeninnukleotide wurde gezeigt, daß fast 100 % des ATPs während der differentiellen Extraktion hydrolysiert werden (Abbildung 9). Damit ist keine Ansäuerung des vakuolären Lumens durch die V-ATPase mehr möglich. Bei einem pH-Anstieg könnte der Farbstoff Arg-CMAC, das Carboxybenzyloxy (CBZ)-Argininamid des 7-Amino-4-Chloromethylcoumarins (Abbildung 29), deprotoniert werden und frei über die Membran diffundieren. Die Immobilisierung des Farbstoffs beruht wahrscheinlich auf der hydrolytischen Spaltung der Amidbindung, möglicherweise mit nachfolgender Kopplung des Coumarinderivats an Glutathion durch Glutathion-S-Transferasen im vakuolären Lumen (Molecular Probes Inc., Eugene, USA). Ein Glutathion-gekoppeltes Derivat sollte allerdings auch bei Änderung des pHs nicht frei diffundieren können. Deshalb ist ein Artefakt durch zu lange Lagerung der Zellen vor der Mikroskopie nicht auszuschließen. In diesem Fall wäre aber eine intakte Morphologie, wie sie beobachtet wurde, sehr unwahrscheinlich.



**Abbildung 29** Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs CMAC-Arg (Molecular Probes Inc., Eugene, USA). Die Pfeile bezeichnen die Proteaseschnittstelle (P) und die Kopplungsstelle an Glutathion (G). CBZ = Carboxybenzyloxy-.

Ein weiteres Indiz für die Intaktheit der vakuolären Membran nach der Nystatinextraktion war die niedrige freie Nystatinkonzentration bei selektiven Extraktionsbedingungen. Da Nystatin nur mit ergosterolhaltigen Membranen hochaffin Porenkomplexe bildet (Bolard 1986), ist bei einer spezifischen Absättigung der Bindungsstellen der Plasmamembran nur ein geringer Teil des Antibiotikums frei in Lösung. Interne Membranen sind für Nystatin nicht zugänglich. Der freie Anteil des Nystatins steigt bei Sättigung der hochaffinen Bindungsstellen an und kann dann auch an intrazelluläre Membranen binden, was durch die partielle Freisetzung vakuolärer Metabolite bei höherer Nystatindosis gezeigt wurde.

Eine Untersuchung der Freisetzungskinetik der Aminosäuren ergab für alle Aminosäuren außer für Glutamat ein Sättigungsverhalten im Permeabilisat innerhalb von etwa 10 bis 12 Minuten bei einer spezifischen Nystatindosis von 20 ng/ g BTM. Für Glutaminsäure wurde ein 30-50%iger Abbau, wahrscheinlich durch Transaminierung während der Extraktionsdauer von 15 Minuten, gefunden. Alle anderen Aminosäurekonzentrationen waren über die Inkubationsdauer konstant. Neben der Dosisabhängigkeit der Extraktion ist dies ein starkes Indiz für die selektive und quantitative Extraktion der cytosolischen Metabolite.

Anhand der Freisetzung von Kalium und der unter Standardbedingungen vorwiegend cytoplasmatisch lokalisierten Aminosäuren Alanin und Glutamin wurde eine quantitative Permeabilisierung der Plasmamembranen gezeigt. Die in der Literatur beschriebene cytosolische Lokalisation der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat konnte mit der neuen Methode nicht bestätigt werden. Aspartat und Glutamat waren unter diesen Bedingungen meist zu etwa 20-50 % im Permeabilisat zu finden. Dieser Anteil war bei identischen Bedingungen sehr variabel und von der Zellcharge abhängig. Auch ein Einfluß der Lagerungszeit der Nystatincharge konnte nicht ausgeschlossen werden.

Bei einem direkten Vergleich der Permeabilisierungseffizienz von Nystatin mit der publizierten Kupfermethode (Ohsumi *et al.* 1988) fiel vor allem bei stationären Kulturen eine Diskrepanz bei der Glutamatverteilung auf (Abbildung 13). Mit Nystatin wurde etwa 7-fach

weniger Glutamat im Cytoplasma bestimmt, als mit Kupferchlorid. Bei einer Evaluierung der Nystatinmethode mit frischen Nystatinchargen wurde eine gute Vergleichbarkeit zur Kupfermethode unter Standardbedingungen gefunden (Abbildung 24). Auffällig ist der 2 bis 3-fach erhöhte cytoplasmatische Gehalt basischer Aminosäuren (Arginin, Ornithin, Lysin) bei Nystatinextraktion ohne osmotische Stabilisierung, was ein geringfügiges Austreten hoch angereicherter vakuolärer Metabolite zeigt. Dabei blieb aber die vakuoläre Membran morphologisch weitgehend intakt, ein Quellen der Vakuole war in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern (Abbildung 15) zu erkennen. Hölzl (1998) postulierte aufgrund von Elektrorotationsexperimenten eine Auflösung der Vakuole in hypoosmotischem Medium mit 50 µg Nystatin/ml nach etwa 10-15 Minuten. Mit osmotischer Stabilisierung konnte der Verlust vakuolärer Anteile verhindert werden, allerdings war die Freisetzung der sauren Aminosäuren deutlich vermindert.

Da Kupfer in *Neurospora crassa* die innere mitochondriale Membran zerstört (Keenan und Weiss 1997) und Nystatin diese aufgrund des geringen Sterolgehalts (Zinser *et al.* 1991, Schneiter *et al.* 1999) nicht permeabilisieren sollte, könnte die Differenz der beiden Methoden auf den mitochondrialen Anteil der sauren Aminosäuren zurückzuführen sein (siehe 3.4). Allerdings erscheint eine aus der Differenz beider Methoden berechnete mitochondriale Glutamatkonzentration von etwa 250 mM unwahrscheinlich. Gegen diese Berechnung sprechen vor allem auch geringfügige Unterschiede der Selektivität beider Methoden, die meisten Aminosäuren wurden mit Nystatin effizienter extrahiert (Abbildung 24).

Bei Anwendung der Nystatinmethode auf Kulturen verschiedener Wildtypstämme bei sehr unterschiedlichen Wachstumsbedingungen wie hyperosmolarem Streß (3.5.2), Hitzeschock (3.5.3), Stickstoffhunger (3.1.3.2) und Kälteadaptation (3.2.4) wurde die beschriebene Selektivität bestätigt. Weiterhin wurde kein Einfluß der Wachstumsmedien auf die etablierte Methode gefunden.

Es konnte eine einfache Routinemethode zur selektiven Extraktion cytoplasmatischer Metabolite mittels Nystatin etabliert werden. Es wurde, wie schon von Avéret *et al.* (1998) beschrieben, eine Abhängigkeit der Permeabilisierungseffizienz vom Molekulargewicht und möglicherweise von der Ladung der Metabolite beobachtet. Nukleotide wurden erst bei erhöhter Nystaindosis freigesetzt, und für die sauren Aminosäuren wurde eine quantitativ schlecht reproduzierbare, zu geringe Freisetzung gefunden. Bei Verwendung von nicht osmotisch stabilisiertem Permeabilisierungspuffer wurde, abhängig von der Zellcharge, ein geringfügiges Austreten in der Vakuole hoch angereicherter Aminosäuren gefunden, wodurch

die bestimmten cytosolischen Konzentrationen von Arginin, Lysin und Ornithin 2 bis 3-fach zu hoch waren.

## **4.2 Dynamische Messungen der Aminosäureverteilung**

Um die physiologische Relevanz des Aminosäuretransports über den Tonoplasten besser zu verstehen, wurde die Aminosäureverteilung in Abhängigkeit der Wachstumsphase und nach abrupter Änderung der Stickstoffversorgung zeitabhängig bestimmt. Die so gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation der Aminosäureverteilung könnten zur Definition geeigneter Bedingungen für die Charakterisierung von Deletionsmutanten der putativen vakuolären Transporter verwendet werden.

### **4.2.1 Abhängigkeit der Aminosäureverteilung vom Wachstumsstadium**

Auffällig war die starke Aminosäureakkumulation während des diauxischen *shifts*. Ab der späten exponentiellen Wachstumsphase waren auch vermehrt metabolisch zentrale Aminosäuren im Kulturüberstand zu finden. Gleichzeitig trat eine Verschiebung der neu synthetisierten Aminosäuren in die Vakuole ein. Asami und Yonezawa (1995) fanden Hinweise auf ein Ansteigen des vakuolären Volumens in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Diese Beobachtungen dokumentieren die ausgeprägte Dynamik der Vakuole als Speicherorganell.

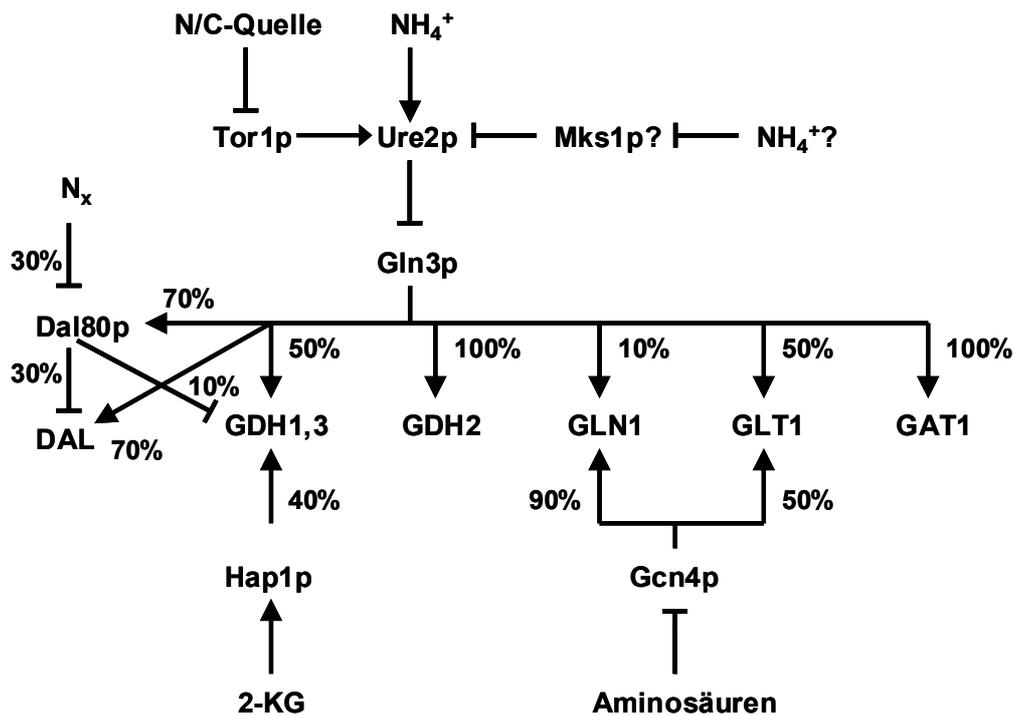
Ein Teil der angehäuften Aminosäuren stammen möglicherweise aus einem erhöhten Proteinabbau während der Umstellung des Zentralstoffwechsels, worauf die Akkumulation von Lysin hindeutet. Lysin ist in hoher Konzentration cytotoxisch (Sumrada und Cooper 1978), und die Biosynthese wird neben der allgemeinen Gcn4p vermittelten Kontrolle (siehe 1.6 und Abbildung 30) durch den Faktor Lys80p reguliert, so daß eine übermäßige Akkumulation verhindert wird (Hinnebusch 1988). Feller *et al.* (1997) konnten zeigen, daß Lys80p ein negativer Regulator des cAMP-PKA-Weges und identisch zu Mks1p (*multy copy suppressor*) ist. Edskes *et al.* vermuteten eine Kontrolle des zentralen Faktors der NCR-Kontrolle, Ure2p, durch Lys80p, dessen Expression durch Ammonium reguliert wird. Die spezifische Inhibition der Lysinbiosynthese ist durch eine Rückkopplungshemmung der beiden nukleären Homocitratsynthase-Isoenzyme (Lys20p und Lys21p) durch das Endprodukt Lysin gegeben. Dadurch wird das coinduzierende Lysin-Biosyntheseintermediat  $\alpha$ -Amino adipinsäure-Semialdehyd ( $\alpha$ AASA) in seiner Konzentration erniedrigt und die Lys14p-abhängige Induktion der Biosynthese verringert (Feller *et al.* 1999). Die Repression der Aminosäurebiosynthese durch Inaktivierung induzierender Faktoren ist typisch für Hefe. Eine beobachtete vakuoläre Akkumulation von Lysin durch Proteolyse konnte somit keine

Inhibition der Biosynthese bewirken. Bei einer Synthese von Lysin außerhalb der Vakuole wäre aber eine Inhibition der Biosynthese und keine starke Akkumulation zu erwarten gewesen.

In glucoselimitierter Kultur fanden Parrou *et al.* (1999) ab der späten exponentiellen Wachstumsphase und während des diauxischen *shifts* eine Akkumulation von Glykogen und eine Induktion verschiedener Gene der allgemeinen Streßantwort. Ab dem diauxischen *shift* akkumuliert auch Trehalose, in einer *ath1*-Deletionsmutante parallel zum Glykogen schon in der späten exponentiellen Phase. Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang mit dem Einsetzen einer Wachstumsinhibition in der späten exponentiellen Phase und der Induktion des Reservekohlenhydratstoffwechsels. Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von Reservekohlenhydraten entspricht der in dieser Arbeit bestimmten Fixierung von Stickstoff in Aminosäuren. Bei Wachstum auf Ethanol und in der stationären Phase wird Glykogen wieder abgebaut, Trehalose wird weiter angehäuft (Parrou *et al.* 1999). Parallel zum publizierten Stoffwechsel des Glykogens wurde in dieser Arbeit eine starke Abnahme der Aminosäuren in der stationären Phase gemessen. Dies zeigt, daß *S. cerevisiae* beim Übergang zu verlangsamtem, glucoselimitiertem Wachstum zunächst ungewöhnlich große Mengen Speichermetabolite akkumuliert, die dann beim Übergang in die stationäre Phase wieder verbraucht werden. Trehalose ist kein typischer Speicherzucker, sondern eine kosmotrope Substanz, die unter vielen Streßbedingungen zum Schutz der zellulären Strukturen synthetisiert wird (Argüelles 2000).

Die gleichzeitige Induktion der Speicherung von Kohlenstoff und Stickstoff weist auf eine enge Verknüpfung der Regulation beider Stoffwechselzweige hin. Ein zentraler Schnittpunkt des C- und N-Metabolismus ist 2-Ketoglutarat (siehe 1.4). Zur Synthese von Aminosäuren muß 2-Ketoglutarat ausreichend zur Verfügung stehen. In der exponentiellen Wachstumsphase, unter voller Glucoserepression, erfüllt der Tricarbonsäurezyklus nur anaplerotische Funktionen. Glutamat, Glutamin, Prolin und Arginin werden aus 2-Ketoglutarat synthetisiert, das Kohlenstoffgerüst der anderen Aminosäuren stammt zu einem großen Teil direkt aus glykolytischen Intermediaten oder aus dem Pentosephosphatweg (Maaheimo *et al.* 2001, Gombert *et al.* 2001). Während des diauxischen *shifts* akkumulierten vor allem Glutamin, Glutamat und Arginin, in der exponentiellen Wachstumsphase Ornithin und Glutamat (Tabelle 10). Die Kohlenstoffreserven werden also effizient zur Fixierung von Stickstoff genutzt. Gleichzeitig wird die Anzahl der in der Vakuole gespeicherten Aminosäuremoleküle bei maximaler Stickstoffspeicherung minimiert, was für eine osmotische Regulation wichtig sein könnte. Ein zentraler Faktor bei der gemeinsamen

Regulation des zentralen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus ist der transkriptionsaktivierende heteromere HAP (*heme activator protein*)-Komplex, bestehend aus mindestens 4 Untereinheiten Hap1-4p. Dieser Komplex reguliert vor allem die Expression von Genen des respirativen Metabolismus, aber auch den Stickstoffmetabolismus über die NADP-GDH (*Gdh1p*). Dieses Schlüsselenzym der Ammoniumassimilation ist bei Wachstum auf Glucose schwächer exprimiert als auf nicht fermentierbaren C-Quellen. Die Expression nimmt bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase zu und nimmt bis zur stationären Phase wieder stark ab (Dang *et al.* 1996). Auch diese Beobachtung korreliert gut mit der hier beschriebenen Zunahme des Gesamtaminosäuregehalts der Zellen. Ein Modell der transkriptionellen Regulation des zentralen Stickstoffmetabolismus (CNM) ist in Abbildung 30 dargestellt. Kürzlich wurde eine Funktion des zentralen Regulators *Ure2p* bei der *Nil1p*-abhängigen Induktion von glucosesensitiven Genen gefunden (Kuruvilla *et al.* 2002.).



**Abbildung 30** Vereinfachter schematischer Überblick über die Transkriptionsregulation des CNM. Im Text ist die Funktion einzelner Faktoren erklärt. Der relative Beitrag der einzelnen Faktoren (%) wurde durch ein mathematisches Modell des CNM abgeschätzt (van Riel 2000). Nomenklatur der Genloci: *GDH1,3* = NADP-abhängige Glutamatdehydrogenasen, *GDH2* = NAD-abhängige Glutamatdehydrogenase, *GLN1* = Glutaminsynthetase, *GLT1* = GOGAT, *GAT1* = generelle Aminosäurepermease. DAL steht für den Allantoinkatabolismus,  $N_x$  für Ammonium aus der Deaminierung verschiedener Substrate. ↓ = Aktivierung, ⊥ = Hemmung. Modifiziert nach ter Schure *et al.* 2000/ van Riel 2000.

Die starke Akkumulation von N- und C-Quellen könnte eine Vorbereitung zur Umstellung auf respirativen Stoffwechsel sein. Da der gesamte Zentralstoffwechsel modifiziert werden muß, ist eine vermehrte Synthese von Makromolekülen in kurzer Zeit nötig, was einen erhöhten Energie- und Metabolitverbrauch mit sich bringt.

In der stationären Phase wurde ein großer Teil der angehäuften Aminosäuren wieder abgebaut, 2-Ketoglutarat konnte im TCA-Zyklus verwertet werden. Auffällig war der verbleibende hohe Arginingehalt. Da Arginin ein niedriges stöchiometrisches C/ N-Verhältnis von 1,5 aufweist, fixiert diese Speicherform nur wenig der verbleibenden Kohlenstoffreserven in der stationären Phase. Interessant wäre eine Bestimmung des verbleibenden Aminosäuregehalts in der stationären Phase nach N-limitiertem Wachstum. Die hier beschriebenen Experimente wurden alle mit Ammoniumüberschuß durchgeführt, so daß eine Speicherung von Stickstoff in der stationären Phase nicht überrascht. Damit wären die Zellen nach Zugabe einer C-Quelle in der Lage, ihre Teilungsaktivität sofort wieder aufzunehmen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Gesamtaminosäuregehalte vom Wachstumsstadium in Schüttelkultur publiziert (Hans *et al.* 2001). Diese Daten stimmen für die quantitativ wichtigsten Aminosäuren relativ gut mit den in dieser Arbeit dokumentierten Verläufen überein, allerdings sind auch deutliche Unterschiede erkennbar. Vor allem eine von den Autoren beschriebene Akkumulation von Valin, Lysin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Phenylalanin in der stationären Phase konnte hier nicht gezeigt werden. Die Unterschiede könnten stammabhängige Regulationsphänomene widerspiegeln (Wiame *et al.* 1985). Allerdings ist der Publikation nicht zu entnehmen, ob C- oder N-limitierte Kulturen verwendet wurden.

#### **4.2.2 Downshift auf L-Prolin**

Nach Überführen von Kulturen, die mit Ammonium als N-Quelle gewachsen waren, auf Medium mit L-Prolin als N-Quelle wurde neben der Verlangsamung des Wachstums und der massiven Aufnahme von Prolin eine Mobilisierung der vakuolären Arginin- und Ornithinspeicher beobachtet. Gleichzeitig wurde die zelluläre Konzentration von Glutamin, Alanin und Serin sehr schnell verringert. Die Ammoniumrepression (siehe 1.5) ist nach dem Überführen auf ammoniumfreies Medium aufgehoben, Gln3p aktiviert die Komponenten des CNM (Kuruvilla *et al.* 2001, siehe Abbildung 30). Prolin aktiviert direkt den Transkriptionsfaktor Put3p und induziert damit die Enzymsysteme für den eigenen Abbau. Gleichzeitig kann die Verarmung einzelner Aminosäuren die Proteinkinase Gcn2p induzieren, die über Aktivierung der Gcn4p-Translation eine generelle Derepression der Aminosäurebiosynthese auslöst (Hinnebusch 1988).

Die Erhöhung der Lysinkonzentration weist auf einen erhöhten Umsatz von Proteinen in der Vakuole durch die Stoffwechselumstellung hin (siehe auch 4.2.1). Ein Hinweis auf einen erhöhten Umsatz in der Vakuole unter diesen Bedingungen liefert der Mechanismus der Wirkung des Antibiotikums Rapamycin, einem Inhibitor von Prolyl-cis-trans-Isomerasen. Dieses induziert über eine physikalische Veränderung von Ure2p unter anderem eine Aufhebung der Ammoniumrepression und eine Aktivierung vakuolärer Proteasen (Hardwick *et al.* 1999, Kuruvilla *et al.* 2001). Coffman und Cooper (1997) zeigten die NCR-sensitive Regulation mehrerer vakuolärer Proteasen.

Messenguy *et al.* (2000) beschrieben die Derepression der zentralen Gene des Argininkatabolismus, *CAR1* (Arginase) und *CAR2* (Ornithintransaminase), bei Stickstoffhunger. *CAR1* wird über Gln3p/Nil1p bei Abwesenheit guter Stickstoffquellen wie Ammonium, Glutamin oder Asparagin aktiviert, was die Mobilisierung von Arginin erklärt. Arginin wird cytosolisch zu Prolin abgebaut und dann im Mitochondrium zu Glutamat katabolisiert.

Auffällig war die Beobachtung, daß der Ornithingehalt nur innerhalb der ersten beiden Stunden nach Überführen auf Prolin abnahm, nach sechs Stunden wieder bis zum Ausgangsniveau anstieg und dann sogar erhöht war. Es fand also eine konstante Mobilisierung von Arginin durch vakuolären Export und Freisetzung von Harnstoff durch Arginase statt, die Umsetzung von Ornithin zu Prolin und dann zu Glutamat war aber nach einer anfänglichen Regulationsphase verzögert. Nach etwa vier Stunden waren die meisten Aminosäurekonzentrationen wieder konstant, was auf die Einstellung einer neuen Homöostase in der Zelle schließen läßt.

Trotz der Mobilisierung von Speicheramino­säuren war der vakuoläre Aminosäuregehalt nicht vermindert. Neben der Akkumulation von Lysin und Prolin war eine Verringerung der cytosolischen Aminosäurekonzentration und eine Verlagerung in die Vakuole zu beobachten, allerdings sind die cytosolischen Gesamtkonzentrationen in Abbildung 21 durch die Unsicherheit bei der Glutamat- und Aspartatverteilung relativ ungenau (siehe 4.1). Neben dem möglicherweise erhöhten proteolytischen Umsatz in der Vakuole erscheint ein vermehrter Import cytosolischer Aminosäuren wahrscheinlich, da die Gesamtkonzentration vieler Aminosäuren konstant und nur der vakuoläre Anteil erhöht war. Diese Beobachtung deutet auf eine Verminderung des aktiven Aminosäureanteils für die Proteinsynthese hin und korreliert mit der Verminderung der Teilungsrate.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Direkt nach Überführen der Kulturen von Ammonium auf Prolin als Stickstoffquelle wird ein Stickstoffhungersignal generiert,

vakuoläre Speicher werden effektiv mobilisiert, die Konzentration zentraler Metabolite wie Alanin, Serin und Glutamin wird schnell vermindert. Der cytosolische Anteil der meisten Aminosäuren wird verringert, der vakuoläre Gesamtaminosäuregehalt bleibt konstant. Nach etwa 2-4 Stunden wird ein neues Fließgleichgewicht in der Zelle etabliert, die zentralen Metabolite erreichen ein konstantes Niveau, Arginin wird langsam weiter mobilisiert.

Es stellt sich die Frage, welche Faktoren an der Regulation vakuolärer Transporter beteiligt sind. Da die Mobilisierung basischer Aminosäuren relativ schnell einsetzte, ist eine konstitutive Expression eines regulierten vakuolären Exporters für basische Aminosäuren, dessen Aktivität eventuell Mep2p- oder Gcn2/4p-abhängig reguliert wird, anzunehmen. Möglich wäre auch ein Antiport mit cytosolischen Aminosäuren, da diese gleichzeitig in die Vakuole transportiert wurden. Allerdings gibt es kaum Hinweise auf Aminosäureantiporter in der vakuolären Membran. Da im Hefegenom etwa 270 ORFs für mögliche nicht-ABC-Transporter identifiziert und in bekannte Familien eingeordnet wurden (B. André, persönliche Mitteilung), ist es sehr unwahrscheinlich, daß eine mögliche vakuoläre Aminosäure-Antiporterfamilie bisher nicht beschrieben wurde. In vakuolären Vesikeln konnte nur ein Arginin-Histidin-Antiporter identifiziert werden (Sato *et al.* 1984b). Plausibel wäre auch die Aktivierung von Importern mit breiter Spezifität und möglicherweise eine einsetzende Autophagie. Aber auch ein erhöhter Verbrauch cytosolischer Aminosäuren bei verlangsamtem Export der proteolytisch entstehenden Aminosäuren aus der Vakuole würde die Verminderung der cytosolischen Anteile erklären. Da die Transportprozesse parallel zur Umstellung des Metabolismus einsetzen, erscheint eine generelle Regulation über die Faktoren Ure2p/ Gln3p/ Nil1p wahrscheinlich. Eine Messung rapamycininduzierter Transportprozesse könnte Aufschluß über die Beteiligung der Tor-Proteinkinasen an der Regulation geben.

Der spezifische Transport strukturell ähnlicher Aminosäuren könnte auch über Faktoren wie Leu3p (siehe unten), die spezifisch einzelne Stoffwechselzweige kontrollieren, reguliert werden. Aufschluß über die Transportregulation könnte die Bestimmung der vakuolären Transportphänomene in Deletions- oder Überexpressionsstämmen der Kontrollfaktoren geben.

#### **4.2.3 Downshift auf Medium ohne Stickstoffquelle**

Wie beim Überführen auf Medium mit Prolin als Stickstoffquelle wird bei Stickstoffhunger die Ammoniumrepression aufgehoben. Allerdings findet keine Gcn4p-abhängige Aktivierung der Aminosäurebiosynthese, sondern eine Repression der Gcn4p-Translation statt (Grundmann *et al.* 2001).

Beim *downshift* auf Hungermedium ohne Stickstoffquelle blieb die Konzentration der zentralen Metabolite Glutamin und Alanin über den gesamten Zeitraum erniedrigt. Die Konzentration der meisten anderen Aminosäuren war nur innerhalb der ersten 2-3 Stunden reduziert, was nicht Gcn4-abhängig über die Aktivierung der *de novo*-Aminosäurebiosynthese zu erklären ist. Allerdings könnte Gln3p-abhängig der CNM aktiviert werden (siehe Abbildung 30). Die Neusynthese von Aminosäuren kann durch den Verlust der Produkthemmung, wie oben für Lysin beschrieben, induziert werden, da die generelle Aminosäurekontrolle nur einen Weg zur Derepression bestimmter Schlüsselenzyme darstellt. Da unter Hungerbedingungen kein Teilungswachstum mehr stattfindet, ist eine Neusynthese von Aminosäuren eventuell nur eingeschränkt nötig, eine effektive Verwertung der zellulären Proteine durch Autophagie führt zu einer erhöhten Freisetzung von Aminosäuren aus abgebauten Proteinen. Die interaktive Regulation von genereller, Gcn4p-vermittelter, und spezifischer Kontrolle des Aminosäurestoffwechsels ist ein sehr komplexes und noch nicht vollständig verstandenes Wechselspiel (Hinnebusch 1988, Dickinson und Schweitzer 1999). Stickstoff für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels wurde durch Mobilisierung von Arginin und Ornithin bereitgestellt. Gleichzeitig setzt bei Stickstoffhunger nach kurzer Zeit Makroautophagie (Scott *et al.* 1996), das heißt die Mobilisierung von Stickstoff durch Abbau nicht essentieller makromolekularer Komponenten der Zelle, ein. Ein gesteigerter Umsatz wurde, wie beim Wachstum auf Prolin, an der Erhöhung der zellulären Lysinkonzentration erkannt.

Die Mobilisierung von Arginin und Glutamin sowie die Akkumulation von Lysin wurde im Verlauf dieser Arbeit schon von Messenguy *et al.* (2000) in Korrelation zur Arginaseaktivität beschrieben. Allerdings wählten die Autoren einen sehr kurzen Zeitrahmen von zwei Stunden für die Analyse der Aminosäureverteilungen. In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten wurde eine fast lineare Abnahme der zellulären Argininkonzentration bei Verarmung des cytosolischen Glutamats beschrieben. Weiterhin wurde eine vorübergehende Abnahme der zellulären Glutamatkonzentration gefunden, allerdings wurde Glutamat in der vorliegenden Arbeit schon zu Beginn des Experiments vorwiegend vakuolär detektiert. Diese Diskrepanz ist auf Probleme bei der Extraktion der sauren Aminosäuren mit Nystatin zurückzuführen. Übereinstimmend wurde gezeigt, daß zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels die zelluläre Konzentration des zentralen Metaboliten des Stickstoffstoffwechsels, Glutamat, relativ konstant sein muß. Um dies zu gewährleisten, müssen die argininabbauenden Enzyme im Cytosol und im Mitochondrium aktiv sein. Da aus Arginin durch die Arginase Harnstoff freigesetzt wird, muß auch die NADP-GDH aktiv sein,

um aus Allophanat freigesetztes Ammonium zu fixieren. Eine Aktivierung des Argininabbaus durch den negativen Regulator Ume6p (siehe unten) sowie den ArgR-Mcm1p-Komplex bei erniedrigter cytosolischer Argininkonzentration wurde diskutiert (Messenguy *et al.* 2000). Eine Regulation der Expression argininabbauender Enzymsysteme durch die cytosolische Argininkonzentration würde eine Regulation auf Ebene des vakuolären Exports ermöglichen. Damit sollte eine Überexpression des vakuolären Argininexporters zu einer Hemmung von Car1p und Car2p führen, so daß die entsprechende Mutante bei Stickstoffhunger Arginin nur langsam mobilisieren könnte. Diese Überlegung zeigt, daß eine Überexpression putativer vakuolärer Transporter bei geeigneten physiologischen Bedingungen eine phänotypische Charakterisierung ermöglichen könnte.

Nach etwa zwei Stunden Hunger wurde eine Verringerung der Mobilisierungsrate der vakuolären Speicher beobachtet. Selbst nach acht Stunden waren noch etwa 40 % der Speicheramino säuren, im Widerspruch zu den von Kitamoto *et al.* (1988) publizierten Daten, nicht abgebaut. Dieser Widerspruch könnte auf Unterschiede zwischen den verwendeten Hefestämmen zurückzuführen sein, da die Wahl des verwendeten Wildtyphintergrundes einen großen Einfluß auf physiologische Experimente hat (Wiame *et al.* 1985, Laizé *et al.* 2000, ter Schure *et al.* 2000).

Der zelluläre Citrullin-, Threonin-, Valin-, Leucin- und Isoleucingehalt war nach *downshift* erniedrigt. Citrullin wird als nicht-proteinogenes Intermediat der Argininbiosynthese unter diesen Bedingungen nicht benötigt. Die Gene für die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren werden über den Transkriptionsfaktor Leu3p reguliert. Die Affinität von Leu3p zu DNA wird durch die Zwischenstufe der Leucinbiosynthese  $\alpha$ -Isopropylmalat ( $\alpha$ IPM), deren Konzentration durch Leucin *feedback*-reguliert wird, erhöht. Der letzte enzymatische Schritt zur Synthese von  $\alpha$ IPM aus der Valinvorstufe  $\alpha$ -Ketoisovalerat wird zudem Gcn4p-aktiviert (Dickinson und Schweitzer 1999). Threonin kann zu  $\alpha$ -Ketobutyrat deaminiert und für die Isoleucinbiosynthese verwendet werden. Betrachtet man diese Verknüpfungen, so könnte die Erniedrigung der Konzentration verzweigtkettiger Aminosäuren und des Threonins mit einer Leucin-unabhängigen Erniedrigung der Leu3p-Aktivierung bei Stickstoffhunger erklärt werden. Da die Synthese des Leu3p-Regulators  $\alpha$ IPM unter Gcn4p-Kontrolle steht, liegt eine direkte Erniedrigung der Leu3p-Konzentration nahe.

Beim Überführen der Kulturen auf Hungermedium wurde, wie schon beim *downshift* auf Prolin, eine Verarmung der cytosolischen Aminosäurekonzentration bei fast konstantem vakuolärem Gehalt beobachtet (Abbildung 21). Allerdings war dieser Effekt auf Hungermedium stärker ausgeprägt. Durch Autophagie wird unter diesen Bedingungen sehr

effektiv ein großer Teil des Cytosols in die Vakuole transportiert. Da fast alle internen Membranen der Zelle ergosterolarm sind (Zinser *et al.* 1991, Schneiter *et al.* 1999), sollten Autophagosomen nicht durch Nystatin permeabilisiert werden. Damit ist die Autophagie wahrscheinlich maßgeblich an der durch Nystatinextraktion bestimmten Verschiebung von Metaboliten in die Vakuole beteiligt. Dazu kommt ein erhöhter Proteinumsatz in der Vakuole, so daß der proteolytisch akkumulierte Aminosäuregehalt dieses Organells ansteigen sollte. Damit könnte eine Verarmung der cytosolischen Anteile durch einen verlangsamten Export aus der Vakuole und einen erhöhten Verbrauch im Cytosol, zum Beispiel durch Proteinsynthese, gesteuert werden. Allerdings ist eine verstärkte Proteinsynthese unwahrscheinlich, da nach einem Überführen auf Hungermedium ein Stop im Zellzyklus einsetzt (Dickinson und Schweitzer 1999). Eine beim *downshift* auf Prolin diskutierte Regulation von Transportern über den generellen Ure2p/ Gln3p-Weg wäre auch unter diesen Bedingungen denkbar.

Mit den *downshift*-Experimenten wurde die Funktion von Arginin und Ornithin als Speicheraminosäuren bestätigt, allerdings wurde im Wildtyp 23344c auch nach acht Stunden Hunger keine vollständige Mobilisierung, wie publiziert (Kitamoto *et al.* 1988), gefunden. Die Umstellung auf die schlechter metabolisierbare Stickstoffquelle Prolin war nach etwa vier Stunden abgeschlossen, es wurde keine drastische Verringerung des Gesamtaminosäuregehalts gefunden. Dagegen wurde ohne Stickstoffquelle innerhalb von acht Stunden 60 % des in Aminosäuren gespeicherten Stickstoffs verbraucht. Bei beiden Experimenten war ein erhöhter Umsatz durch die Akkumulation von Lysin zu erkennen. Gleichzeitig wurde unter beiden Bedingungen eine deutliche Verschiebung aller Aminosäuren in die Vakuole beobachtet.

#### **4.2.4 Überführen stickstoffgehungelter Kulturen auf Ammonium**

Durch die *downshift*-Experimente konnten physiologische Bedingungen gefunden werden, unter denen ein verstärkter Transport von Aminosäuren über den Tonoplasten stattfindet, speziell die Mobilisierung der Speicheraminosäuren konnte verfolgt werden. Durch das Überführen der gehungerten Kulturen in frisches Medium sollte die Speicherung vakuolärer Aminosäuren zeitabhängig verfolgt werden.

Nach dem Überführen in frisches Medium mit Ammonium wurde für stickstoffgehungerte Kulturen und solche, die auf Prolin gewachsen waren die gleiche Reaktion beobachtet. Die Zellen akkumulierten innerhalb weniger Stunden deutlich mehr Glutamin, Ornithin und Arginin als exponentiell wachsende Übernachtskulturen auf Ammonium. Die Konzentration von Alanin war kurz nach dem Überführen in frisches Medium auf dem Kontrollniveau, nach

sechs Stunden wurde der Aminosäuregehalt von Übernachtskulturen (balanciertes Wachstum) erreicht. Da die Zelldichte beim *upshift* stickstofflimitierter Kulturen (Wachstum auf Prolin) in frisches Medium relativ hoch war ( $OD_{600} = 3,4$ ), waren nach etwa 8 Stunden (etwa 2 Teilungszyklen) Akkumulationseffekte der späten exponentiellen Wachstumsphase erkennbar (siehe Tabelle 10). Deshalb wurde kein balanciertes Wachstum, wie bei gehungerten Kulturen beobachtet, erreicht.

Da zum Zeitpunkt des *upshifts* neben einem Ammoniumüberschuß auch ein Glucoseüberschuß vorhanden war, konnten durch den Zentralstoffwechsel sehr schnell Kohlenstoff und Energie zur Aminosäuresynthese bereitgestellt werden. Da 2-Ketoglutarat essentiell für die Synthese von Glutamat, Glutamin, Ornithin und Arginin ist und die Akkumulation sofort nach dem *upshift* einsetzte, mußte mindestens eine Isoform der Isocitratdehydrogenase während der Hungerphase exprimiert sein. *S. cerevisiae* besitzt zwei mitochondriale NAD-abhängige Isoformen (Idh1p, Idh2p), eine mitochondriale (Idp1p) und eine cytosolische (Idp2p) NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase. Eine *idh2idp1*-Doppeldelentionsmutante ist bei Wachstum auf Glucose glutamatauxotroph (Dickinson und Schweitzer 1999), was zeigt, daß eine mitochondriale Aktivität für die Glutamatsynthese essentiell ist. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den durch metabolische Markierungsexperimente und Metabolitanalyse modellierten Stoffflüssen. Nach den publizierten Modellen erfüllen Enzyme des Tricarbonsäurezyklus im Mitochondrium bei Wachstum auf Glucose anaplerotische Funktionen (Maaheimo *et al.* 2001, Gombert *et al.* 2001).

Die Akkumulation von Aminosäuren setzte sofort nach dem Überführen der Kulturen auf Ammonium ein. Die zur Stickstofffixierung nötigen Enzymsysteme des CNM waren also unter Mangelbedingungen deaktiviert, nicht aber abgebaut. Auf genetischer Ebene kann die NADP-GDH-Expression durch 2-Ketoglutarat und den Hap-Komplex aktiviert werden (Abbildung 30). Bei Aufhebung der Hungerbedingungen kann die Aminosäurebiosynthese Gcn4p-abhängig induziert werden (Hinnebusch 1988, Grundmann *et al.* 2001). Vor allem die Enzyme des Acetylglutamatwegs sind Gcn4p-abhängig sowie allosterisch durch Arginin reguliert (Hinnebusch 1988, Soetens *et al.* 1998).

Trotz der Tatsache, daß Arginin im Mitochondrium die eigene Biosynthese durch Rückkopplung hemmt (Soetens *et al.* 1998), konnte die Argininsynthese schnell aktiviert werden. Kurz nach dem *upshift* wurde die zelluläre Argininkonzentration deutlich erhöht, die cytosolische Konzentration stieg aber erst bei Erreichen des balancierten Wachstums deutlich an, so daß das neu synthetisierte Arginin kaum in die Mitochondrien, sondern in die Vakuole

transportiert wurde. Allerdings wurde von Messenguy *et al.* (2000) eine Aktivierung des Argininabbaus durch einen niedrigen cytosolischen Argininspiegel via Ume6p/ ArgR/ Mcm1p diskutiert. Damit wird deutlich, daß neben der direkten Rückkopplung auch weitere, von der Arginkonzentration unabhängige Mechanismen zur Regulation des Argininmetabolismus vorhanden sein müssen. Wahrscheinlich hemmt Ammonium über den Ume6p/ Sin3p/ Rpd3p-Komplex die Expression der argininabbauenden Enzyme Arginase (Car1p) und Ornithinaminotransferase (Car2p) (Messenguy *et al.* 2000). Fällt die Arginasekonzentration, so dissoziiert der Komplex aus Arginase und Ornithincarbamoylphosphatsynthase, und der anabole Teil des Harnstoffzyklus wird aktiviert (Jauniaux *et al.* 1978).

Nach dem Überführen der gehungerten Kulturen auf Ammonium wurde innerhalb von sechs Stunden der cytosolische Gehalt, der während des Stickstoffhungers herunterreguliert wurde, regeneriert. Dieser Zeitrahmen spricht für eine Neusynthese im Cytoplasma nach Gcn4p-abhängiger Induktion der Enzymsysteme und Erreichen eines neuen Fließgleichgewichts des Zellstoffwechsels. Die in den ersten Stunden nach *upshift* neu synthetisierten Speicheramino­säuren wurden direkt in die Vakuole transportiert. Für diese Aminosäuren muß ein aktiver Kontrollmechanismus vorhanden sein, der gleichzeitig mit der Aktivierung der Biosynthese eine Aminosäuresequestrierung bewirkt. Eine Regulation der Synthese und des Transports durch dieselben Faktoren liegt daher nahe. Eine Analyse der Promotorregionen putativer Transportergene im Vergleich mit den transkriptionell regulierten Genen des Metabolismus der Speicheramino­säuren könnte eine Identifizierung des vakuolären Transporters für basische Aminosäuren erleichtern.

### **4.3 Charakterisierung von Deletionsmutanten**

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur selektiven Metabolitextraktion sollte zur Identifizierung vakuolärer Aminosäuretransporter genutzt werden. Da basische Aminosäuren in der Vakuole hoch angereichert sind, wurden ammoniumlimitierte Übernachtskulturen von Deletionsstämmen putativer Transporter mit Lysin und Arginin supplementiert und vier Stunden weiter kultiviert. In diesem Zeitraum ist eine Induktion der Enzyme für den Katabolismus und den Transport möglich, so daß bei Deletion eines vakuolären Transporters für basische Aminosäuren ein Phänotyp zu erwarten gewesen wäre. Bei Anwesenheit von Ammonium werden Arginin und Lysin über die Argininpermeasen Apl1p und Can1p und die Lysinpermease Lyp1p aufgenommen, bei Derepression durch Sinken der Ammoniumkonzentration wird die generelle Aminosäurepermease Gap1p exprimiert (Forsberg und Ljungdahl 2001b). Da Lysin nicht abgebaut wird (Sumrada und Cooper 1978)

und dadurch in hoher Konzentration cyotoxisch ist, muß es hochaffin in die Vakuole transportiert werden. Wie in Abbildung 16 dargestellt, waren der zelluläre Arginin- und Lysingehalt 1,5-fach bzw. 2-fach durch Akkumulation in der Vakuole erhöht. Allerdings führte die Stickstofflimitierung und Lysinakkumulation in Verbindung mit niedrigem pH in ungepufferten Kulturen zu einem Sterben der Zellen. Ein metabolischer Defekt der gestreßten Zellen war an einer drastischen Verringerung des Glutamin- und Glutamatgehalts zu erkennen.

Da in Schüttelkultur physiologische Parameter wie pH, Belüftung und Temperatur nicht exakt kontrolliert werden, ist auch eine, wenn auch sehr geringe, Differenz der Teilungsrate paralleler Kulturen und eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit zu erwarten. Deshalb sind die in 3.2.1 beschriebenen Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutanten, die quantitativ schwer reproduzierbar waren, wahrscheinlich nicht spezifisch auf die Deletionen einzelner ORFs, sondern auf Unterschiede im Anteil intakter Zellen unter diesen Bedingungen zurückzuführen.

Bei Deletionsmutanten konstitutiv exprimierter putativer Transporter konnte unter Standardbedingungen kein Unterschied zum Wildtyp in der Aminosäureverteilung gefunden werden; der durch YCR023c codierte putative vakuoläre Transporter konnte nicht mit dem Aminosäure- oder Polyaminstoffwechsel in Verbindung gebracht werden. Der von Kooperationspartnern identifizierte kältesensitive Deletionsstamm des ORFs YMR126c zeigte bei balanciertem Wachstum bei 15 °C ebenfalls keinen Phänotyp. Da Russnak *et al.* (2001) einige der untersuchten ORFs als Gene für vakuoläre Aminosäuretransporter beschrieben, wird deutlich, daß die *in vivo*-Bestimmung der Metabolitverteilung nur unter sehr spezifischen physiologischen Bedingungen erfolgreich zur Charakterisierung von Mutanten eingesetzt werden kann. Die dynamischen Messungen der Aminosäureverteilungen zeigten, daß vor allem sehr kurz nach Überführen von Kulturen in Medien mit einer anderen Stickstoffversorgung ein verstärkter vakuolärer Transport zu erwarten ist (Abbildung 22). Allerdings waren selbst unter Hungerbedingungen die Gesamtgehalte vieler Aminosäuren kaum verändert, eine allgemeine Verlagerung in die Vakuole war zu beobachten. Für diese meist relativ niedrig konzentrierten Aminosäuren ist nicht klar, wie groß der Anteil durch Proteolyse in der Vakuole im Vergleich zum biosynthetischen Anteil ist. Daher ist, wie von Russnak *et al.* (2001) gezeigt, die direkte Messung des Aminosäuretransports vakuolärer Vesikel der geeignetere Weg zur Charakterisierung der Mutanten von Transportern niedrig konzentrierter zellulärer Metabolite. Allerdings ist auch bei diesem Ansatz eine große Anzahl Messungen nötig. Zur *in vivo*-Charakterisierung von transportdefizienten Mutanten zellulär

niedrig konzentrierter Aminosäuren müßten die betreffenden Substrate dem Medium zugesetzt werden. Ein physiologisches *screening* solcher Transportdefekte könnte durch Supplementation des Mediums mit strukturell verwandten Aminosäuren in Gruppen vereinfacht werden. Bei einer hohen Redundanz der Transportsysteme wie sie bei Transportern der Plasmamembran in Hefe beobachtet wurde (Wieczorke *et al.* 1999, Forsberg und Ljungdahl 2001b), ist dieser Ansatz nur bei Mehrfachdeletionen erfolgversprechend.

Für das Produkt des im Stamm ME020 deletierten Gens wurde eine Funktion beim Transport basischer Aminosäuren über die vakuoläre Membran bei Wachstum auf Harnstoff vermutet. Deshalb wurde eine dynamische Bestimmung der Aminosäureverteilung nach *downshift* auf Harnstoff durchgeführt. Unter diesen Bedingungen waren durch Kooperationspartner Hinweise auf einen Defekt bei der Mobilisierung interner Aminosäuren gefunden worden (siehe 3.3.3). Da Harnstoff keine optimale Stickstoffquelle für Hefe ist (Cooper 1982), wurde, wie beim Wachstum auf Prolin, eine deutliche Mobilisierung vakuolärer Speicher erwartet. Die beobachteten Effekte nach *downshift* waren zwar qualitativ vergleichbar zu denen beim *shift* auf Prolin, allerdings deutlicher schwächer ausgeprägt und kurzzeitiger. Nur innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden nach dem Überführen auf Harnstoff war die Konzentration der metabolisch zentralen Aminosäuren verändert, Arginin wurde geringfügig abgebaut. Auch die Teilungsrate wird durch Harnstoff kaum beeinflusst (Cooper 1982), was zeigt, daß Harnstoff zwar die NCR aufhebt (Wiame *et al.* 1985, ter Schure *et al.* 2000), aber eine relativ gut verwertbare Stickstoffquelle ist. Wie in 4.2.2 und 4.2.3 diskutiert, ist eine generelle Regulation der Aminosäuretransporter anzunehmen. Daher konnte auch eine Induktion des betrachteten Gens auf Harnstoff beobachtet werden. Der Aminosäurestoffwechsel ist neben der generellen Regulation aber feinreguliert, was am Unterschied der Effekte auf Harnstoff und Prolin sehr deutlich wird. Daher konnte bei der geringfügigen Veränderung der *in vivo*-Konzentrationen der Aminosäuren kein Phänotyp beobachtet werden. Ein entsprechendes Experiment mit Prolin als dereprimierende Stickstoffquelle könnte mehr Erfolg versprechen.

#### **4.4 Vakuolärer Transport und Streß**

Neben ihrer Funktion als Bausteine für Proteine sind Aminosäuren unter anderem Vorläufer verschiedener Effektoren, und Metabolite und spielen in Form des Tripeptids Glutathion eine wichtige Rolle im Redoxgleichgewicht der Zelle. Eine weitere Funktion von Aminosäuren in Mikroorganismen ist die Akkumulation als kompatible Solute bei hyperosmolarem Streß (Yancey *et al.* 1982). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt eine hohe Speicherkapazität für Aminosäuren in der Vakuole. Die Vakuole hat eine wichtige, aber noch kaum verstandene

Funktion bei der Osmoregulation. Neben ionischen Prozessen wie der Akkumulation von Natrium (geschlossen aus der Osmosensitivität und einer veränderten vakuolären Morphologie einer *nhx1*-Deletionsmutante, Naß und Rao 1999, Serrano *et al.* 1999) und Aminosäuretransport wäre auch die Akkumulation des wichtigsten kompatiblen Soluts bei hyperosmolarem Streß, Glycerol, in der Vakuole eine Möglichkeit zur Osmoregulation.

Bei Hitzestreß akkumuliert Hefe große Mengen des kosmotropen Zuckers Trehalose, die unter normalen Wachstumsbedingungen durch Trehalasen wieder mobilisiert werden. Neben der cytosolischen Trehalase Nth1p existiert eine vakuoläre Trehalase Ath1p, deren Funktion nicht bekannt ist. Deshalb ist ein Transport und eine Akkumulation von Trehalose in die Vakuole denkbar.

Diese Fragestellungen wurden mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur selektiven Extraktion von Metaboliten untersucht.

#### **4.4.1 Hyperosmolare Bedingungen**

Exponentiell wachsende Zellen wurden vier Stunden bei einer hohen NaCl-Konzentration inkubiert und permeabilisiert. Es ist zu beachten, daß neben dem hyperosmolaren Streß auch die Toxizität von Natrium unter diesen Bedingungen eine Rolle spielt. Eine getrennte Betrachtung dieser Phänomene wäre durch eine Einstellung der Osmolarität mit Sorbit und Vergleich zu NaCl möglich. Neben der Synthese hoher Konzentrationen von Glycerol war eine Verschiebung aller Aminosäuren aus der Vakuole ins Cytosol zu beobachten. Die basischen Speicheraminosäuren waren insgesamt deutlich erhöht. Die Zellen nutzten neben der Glycerolsynthese die hohe Speicherkapazität für Aminosäuren, um die Wasseraktivität im Cytosol zu erniedrigen und so den osmotischen Gradienten über die Plasmamembran zur Aufrechterhaltung des Zellurgors ausgleichen. Da unter Normalbedingungen vor allem basische Aminosäuren strikt vakuolär vorkommen, führt eine Regulation des Transports über den Tonoplasten also auch bei Salzstreß zu wichtigen Anpassungserscheinungen. Goossens *et al.* (2001) publizierten während dieser Arbeit einen Einfluß des Gcn2p/ Gcn4p-Systems auf die Natriumtoxizität in Hefe. Weiterhin zeigten die Autoren eine Induktion der Gcn2p-abhängigen Aktivierung der generellen Kontrolle des Aminosäurestoffwechsels durch NaCl und beobachteten eine erhöhte Salztoleranz in Deletionsmutanten dieses Aktivierungswegs. Pascual-Ahuir *et al.* (2001) zeigten dagegen eine erniedrigte Toleranz gegen  $K^+$  und  $Na^+$  in *gcn4*-Deletionsstämmen und vermuteten als Grund Aminosäurehunger durch Hemmung des Aminosäureimports durch  $Na^+$ . Daher postulierten die Autoren, daß eine übermäßige Aktivierung des Gcn2p-Wegs durch Salz, abhängig von den physiologischen Bedingungen, zu einem Verlust der Salztoleranz führt. Eine Erklärung könnte der in dieser Arbeit gefundene

hohe cytosolische Lysingehalt sein, der zu einer Inhibition des Wachstums führen könnte (Sumrada und Cooper 1978). Weiterhin wurde hier eine Akkumulation von Aminosäuren im Cytosol gezeigt, was die Beobachtungen von Pascual-Ahuir *et al.* (2001) erklärt. Aminosäuren tragen unter diesen Bedingungen zur Erniedrigung der Wasseraktivität im Cytosol bei. In dieser Arbeit wurde erstmals eine direkte Funktion der Akkumulation und Kompartimentierung von Aminosäuren bei Salzstreß dokumentiert. Bei genomweiten Studien zur Regulation von Genen unter Salzstreß wurde eine Induktion von Genen aminosäureabbauender Enzyme, darunter des *CARI*-Gens (Arginase), gefunden (Rep *et al.* 2000). Außerdem wurde bei hyperosmolarem Streß eine Induktion einiger Gene des Glyoxylatzyklus gefunden (Gasch *et al.* 2000).

Auffällig war die deutlich geringere Akkumulation der Harnstoffzyklusintermediate Ornithin und Citrullin sowie die leicht erhöhte Lysinkonzentration in der trehalasefreien Mutante, was auf einen regulatorischen Defekt dieses Stamms hindeutet. Um diesen näher zu charakterisieren, wären weitergehende Studien der Induktion und Aktivität der Komponenten des CNM und eine Bestimmung des Anteils lebender Zellen unter Salzstreß nötig.

Die Glycerolverteilung konnte nicht bestimmt werden, da Glycerol zu 100 % im cytoplasmatischen Extrakt gefunden wurde, was durch eine rein cytoplasmatische Lokalisierung oder eine Permeabilität des Tonoplasten für Glycerol erklärt werden kann. Eine aktive Aufnahme in vakuoläre Vesikel wurde nicht gefunden (I. Bellahn, persönliche Mitteilung). Eine Anreicherung durch freie Diffusion könnte im Vesikelsystem durch Beobachtung des Vesikelvolumens im *stopped flow*-Fluorimeter bei Zugabe von Glycerol zu fluoreszenzgefärbten Vesikeln gemessen werden (Coury *et al.* 1999). Eine Erhöhung des Vesikelvolumens kann an der Veränderung der Fluoreszenzintensität gemessen werden.

#### **4.4.2 Hitzeschock**

Die subzelluläre Verteilung von Trehalose konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da eine freie Diffusion bei selektiver Permeabilisierung nicht sicher gezeigt werden konnte. Obwohl quantitativ nicht vergleichbar, wurde mit Nystatin und Kupferchlorid ein deutlicher Anteil der Trehalose in der Vakuole bestimmt. Dabei ist aber zu beachten, daß Trehalose ein etwa 3-fach höheres Molekulargewicht als Aminosäuren hat, für die beide Methoden entwickelt wurden. Dazu kommt ein ungewöhnlich großes Hydratationsvolumen (Sola-Penna und Meyer-Fernandes Jr. 1998), das eine freie Diffusion über Poren der permeabilisierten Plasmamembran verhindern könnte. Simola *et al.* (2000) berichteten von einer Funktion der Trehalose bei der Proteinfaltung im ER, was eine Lokalisation in diesem Kompartiment voraussetzt. Um zu bestimmen, ob Trehalose nach Hitzeschock rein cytoplasmatisch vorliegt,

wurde eine Präparation intakter Vakuolen und eine GC-Analyse der Fraktionen durchgeführt. Bei Anwesenheit hoher Konzentrationen Sorbit oder Saccharose konnte allerdings per GC nur eine grobe Abschätzung der Trehalosekonzentration vorgenommen werden, für die Fraktionen des Dichtegradienten konnte keine Aussage getroffen werden. Hierzu müßte eine HPLC-Analyse oder eine Vorreinigung der Trehalose oder deren TMS-Derivat durch SP(M)E durchgeführt werden. Überraschend war der extrem hohe Verlust an Trehalose während der Protoplastierung der Zellen, auch in der trehalasefreien Mutante, was einen enzymatischen Abbau ausschließt. Da bei der Protoplastierung unphysiologische Bedingungen auf die Zellen einwirken, wäre ein unspezifischer Export der Trehalose aus der Zelle denkbar. Neben den beiden bekannten Trehalaseaktivitäten wurde ein Gen identifiziert, das dem der neutralen Trehalase zu 77 % identisch ist (*NTH2*, ORF *YBR0106*). Allerdings konnte keine Trehalaseaktivität des Genprodukts gefunden werden (Nwaka *et al.* 1995). Somit konnte keine Aussage über die Trehaloseverteilung getroffen werden.

Nach einem einstündigen Hitzeschock wurde eine Erhöhung des Gesamtgehalts von Glutamat, Arginin und Alanin in Zellen des Wildtyps gefunden. Diese Beobachtung zeigt eine streßabhängige Regulation des CNM und einen sehr aktiven Zentralmetabolismus. Da die Lysinkonzentration nicht erhöht war, ist nicht von einer verstärkten proteolytischen Aktivität in der Vakuole auszugehen (siehe 4.2.2, 4.2.3). In der trehalasefreien Mutante war Arginin, vor allem aber Glutamin, deutlich erniedrigt. Da die Synthese von Glutamin ATP-abhängig ist, deutet dieser Phänotyp, wie die Aminosäurebestimmung bei Salzstreß schon vermuten ließ, auf einen gestörten Zentralmetabolismus hin. Ein Einfluß des Umsatzes kompatibler Solute bei der Adaptation an Salzstreß auf den Zentralmetabolismus wurde von Blomberg (2000) vorgeschlagen: Ein zyklischer Umsatz von Glycerol und Trehalose unter Verbrauch energiereicher Phosphate könnte bei hyperosmotischem Schock die Zelle vor einem Verarmen des zellulären Phosphats und einer metabolischen Deregulation schützen. Diese Idee zeigt, daß sehr indirekte Mechanismen, die oft nicht intuitiv gefolgert werden können, einen Einfluß auf zentrale Stoffwechselwege haben können. Sollte ein derartiger Mechanismus bei Hitzeschock eine Rolle spielen, wäre allerdings eine erhöhte Sterberate der trehalasefreien Mutante zu erwarten gewesen, was nicht beobachtet wurde.

Welche Faktoren an der Regulation des Aminosäurestoffwechsels bei Hitzestreß beteiligt sind und welche physiologische Relevanz eine erhöhte Akkumulation der Metabolite unter diesen Bedingungen hat, ist noch völlig unklar. Eine Untersuchung der genomweiten Genexpression nach Hitzeschock zeigte eine Repression vieler Gene der Aminosäurebiosynthese, lediglich das *ARG3*-Gen, codierend für die Ornithincarbamoyltransferase, war induziert. Weiterhin

wurde eine Induktion des *CARI*-Gens, codierend für die Arginase gefunden. (Gasch *et al.* 2000, Causton *et al.* 2001). Spezifische Untersuchungen der Enzymaktivitäten und Genregulation des Aminosäurestoffwechsels nach Hitzeschock stehen noch aus, so daß kein Modell vorgeschlagen werden kann. Die Aminosäureverteilungen unter Streßbedingungen zeigten allerdings, daß der Aminosäurestoffwechsel nicht nur durch Änderungen der Nährstoffversorgung sondern auch spezifisch durch andere Streßbedingungen reguliert wird.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden physiologische Studien zur metabolischen Kompartimentierung in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Ziel war die *in vivo* Charakterisierung vakuolärer Transportprozesse und die Untersuchung von Deletionsstämmen putativer vakuolärer Aminosäuretransporter.

1. Es wurde eine neue, einfache Methode zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* etabliert. Diese Methode ist für die Bestimmung der vakuolären und cytosolischen Anteile von Aminosäuren und Polyaminen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen anwendbar. Allerdings wurde für Glutamat und Aspartat eine schlechte Reproduzierbarkeit der Extraktion gefunden.
2. Mit der neu etablierten Methode wurde die Aminosäureverteilung verschiedener Deletionsstämmen putativer Aminosäuretransporter unter verschiedenen physiologischen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Es konnten allerdings keine neuen Transporter beschrieben werden, was zeigt, daß in *Saccharomyces cerevisiae* ein phänotypisches *screening* auf Transportdefekte nur unter sehr spezifischen Bedingungen erfolgreich ist.
3. Durch Bestimmung der subzellulären Aminosäureverteilung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in *batch*-Kulturen konnte eine deutliche Abhängigkeit der Stickstoff-assimilation von der Wachstumsphase beschrieben werden. Die beobachtete Abhängigkeit legt eine enge Verknüpfung mit dem Kohlenhydratstoffwechsel nahe.
4. Durch die zeitabhängige Messung der Aminosäureverteilung nach einem *shift* auf Medien mit mangelnder Stickstoffversorgung konnte *in vivo* die Mobilisierung der vakuolären Aminosäurespeicher (Arginin, Ornithin) dokumentiert werden; Lysin akkumulierte unter diesen Bedingungen. Aufgrund der unterschiedlich stark ausgeprägten physiologischen Reaktionen konnte die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoffquellen in steigender Reihenfolge eingeordnet werden:

Ammonium > Harnstoff > Prolin (> Stickstoffhunger).

5. Nach Überführen stickstoffgehungelter Kulturen auf Ammonium wurde *in vivo* die Assimilation von Stickstoff anhand der Aminosäureverteilung dokumentiert. Eine schnelle transiente Akkumulation basischer Aminosäuren direkt nach *upshift* zeigte neben der gut charakterisierten Induktion der biosynthetischen Gene eine Regulation auf Proteinebene.

6. Es konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, daß bei hoher NaCl-Konzentration gewachsene Zellen Aminosäuren als kompatible Solute nutzen. Es wurde eine Erhöhung der Konzentration basischer Aminosäuren bei gleichzeitiger Verschiebung aller Aminosäuren ins Cytosol beobachtet.
7. Bei Hitzeschock wurde eine Erhöhung der Konzentration metabolisch zentraler Aminosäuren gefunden. Die subzelluläre Verteilung der Aminosäuren war nicht verändert.
8. Für eine trehalasefreie Mutante wurde auf einen metabolischer Defekt unter Hitzestress aufgrund der drastisch verringerten Konzentration von Glutamin geschlossen. Ein Unterschied der Lebensfähigkeit der Zellen nach Hitzeschock im Vergleich zum Wildtyp wurde nicht beobachtet. Unter hyperosmolaren Bedingungen wurde eine deutlich verringerte Akkumulation von Ornithin und Citrullin in der Mutante gemessen. Weiterhin wurden Hinweise auf eine teilweise vakuoläre Lokalisation von Trehalose bei Hitzestress gefunden.

## 6 Anhang

### 6.1 CBS-Medium nach Verduyn et al. (1992):

#### 1000 x Vitaminlösung:

D-Biotin	0,05 g
Ca-D-Panhotenat	1,00 g
Nikotinsäure	1,00 g
myo-Inositol	25,00 g
Thiaminhydrochlorid	1,00 g
Pyridoxalhydrochlorid	1,00 g
p-Aminobenzoesäure	0,20 g

Biotin wurde in 10 ml 0,1 M NaOH gelöst, mit Reinstwasser auf 0,75 l aufgefüllt und der pH mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt. Danach wurden unter pH-Kontrolle alle weiteren Bestandteile einzeln zugesetzt. Das Gesamtvolumen wurde mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt, der pH erneut kontrolliert. Die sterilfiltrierten Aliquots konnten 6 Monate bei 4°C gelagert werden.

#### 1000x Spurenelementlösung:

Na <sub>2</sub> EDTA	15 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,5 g
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,0 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,3 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,3 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0 g
KI	0,1 g

EDTA und Zinksulfat wurden in 0,75 l Reinstwasser gelöst und der pH mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt. Alle weiteren Komponenten wurden einzeln unter pH-Kontrolle gelöst und der pH mit 1 M HCl auf 4,0 eingestellt. Sterilfiltrierte Aliquots wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 10x Natriumsuccinatpuffer

Bernsteinsäure 100 g/l

Der pH wurde mit 6M NaOH auf 5,5 eingestellt, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die sterilfiltrierte Stammlösung bei 4 °C gelagert.

### **5x Kaliumphthalatpuffer**

Kaliumhydrogenphthalat                    100 g/l

Der pH wurde mit 6M KOH auf 5,5 eingestellt, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die sterilfiltrierte Stammlösung bei 4 °C gelagert.

### **5x Natrium-Kaliumphthalatpuffer**

Kaliumhydrogenphthalat                    100 g/l

NaOH    12 g/l

Der pH wurde mit 6M KOH auf 5,5 eingestellt, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die sterilfiltrierte Stammlösung bei 4 °C gelagert.

### **6.1.1 Standardzusammensetzung**

Glucose                                        20,0 g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                                    5,0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                                        3,0 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                                0,5 g

1000x Vitaminlösung                        1 ml

1000 Spurenelemente                      1 ml

Uracil                                         0,05 g

Pufferstammlösung                        0,1 l (10x Stammlösung) bzw. 0,2 l (5x Stammlösung,  
optional)

*ad* 1 l deionisiertes Wasser

Das Medium wurde sterilfiltriert nicht länger als 3 Wochen bei 4°C gelagert.

## 6.2 Permeabilisierungskinetik

Die kompletten Daten des in 3.1.2 beschriebenen Experiments sind in Tabellenform wiedergegeben.

Tabelle 15 Permeabilisierungskinetik, Aminosäuren im Permeabilisat.

Inkubations-zeit [min]	0		1		5		10		15		Aufschluß							
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]							
Asp	0,0	+/-	0,0	0,6	+/-	0,2	1,9	+/-	0,1	3,7	+/-	0,1	5,0	+/-	0,2	8,7	+/-	4,9
Glu	0,0	+/-	0,0	2,0	+/-	0,5	6,1	+/-	0,2	17,5	+/-	0,8	22,3	+/-	0,1	71,4	+/-	4,8
Asn	0,0	+/-	0,0	0,2	+/-	0,1	0,8	+/-	0,0	1,4	+/-	0,1	1,5	+/-	0,0	6,2	+/-	0,3
Ser	0,0	+/-	0,0	1,1	+/-	0,3	3,5	+/-	0,0	5,0	+/-	0,1	5,3	+/-	0,1	19,0	+/-	0,1
Gln	0,0	+/-	0,0	1,5	+/-	0,6	8,6	+/-	0,1	14,1	+/-	0,1	14,9	+/-	0,1	36,7	+/-	2,7
His	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	2,6	+/-	0,4
Gly	0,0	+/-	0,0	1,0	+/-	0,3	3,0	+/-	0,0	3,7	+/-	0,1	4,0	+/-	0,0	14,9	+/-	0,7
Thr	0,0	+/-	0,0	0,6	+/-	0,2	2,1	+/-	0,1	3,8	+/-	0,2	4,1	+/-	0,2	7,6	+/-	0,3
Arg	0,0	+/-	0,0	1,0	+/-	0,2	1,7	+/-	0,1	3,5	+/-	0,2	6,1	+/-	0,1	102,8	+/-	2,2
Tyr	0,0	+/-	0,0	0,2	+/-	0,1	0,2	+/-	0,0	0,3	+/-	0,0	0,3	+/-	0,0	3,3	+/-	0,0
Ala	0,0	+/-	0,0	2,3	+/-	0,5	10,2	+/-	0,6	14,3	+/-	0,1	14,3	+/-	0,1	32,9	+/-	0,6
Trp	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,1	+/-	0,1	0,2	+/-	0,1	0,2	+/-	0,1	1,6	+/-	0,0
Met	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,1	+/-	0,1	0,2	+/-	0,1	0,2	+/-	0,0	2,3	+/-	0,0
Val	0,0	+/-	0,0	0,2	+/-	0,1	0,7	+/-	0,1	1,3	+/-	0,1	1,6	+/-	0,1	12,0	+/-	0,7
Phe	0,0	+/-	0,0	0,0	+/-	0,0	0,1	+/-	0,1	0,1	+/-	0,0	0,1	+/-	0,0	3,5	+/-	0,2
Ile	0,0	+/-	0,0	0,2	+/-	0,1	0,5	+/-	0,1	0,6	+/-	0,1	0,7	+/-	0,1	7,2	+/-	0,2
Leu	0,0	+/-	0,0	0,3	+/-	0,0	0,6	+/-	0,1	0,7	+/-	0,1	0,8	+/-	0,1	8,6	+/-	0,3
Orn	0,0	+/-	0,0	2,0	+/-	0,2	1,3	+/-	0,2	3,4	+/-	0,7	4,6	+/-	0,9	36,3	+/-	1,0
Lys	0,0	+/-	0,0	0,6	+/-	0,0	0,4	+/-	0,0	1,0	+/-	0,2	1,3	+/-	0,1	21,3	+/-	0,3
<b>Gesamt</b>	0	+/-	0	13,8	+/-	3,4	41,9	+/-	2	74,8	+/-	3,2	87,3	+/-	2,3	398,9	+/-	19,7

Tabelle 16 Permeabilisierungskinetik, Aminosäuren im Zellpellet.

Inkubationszeit [min]	0		1		5		10		15		Aufschluß	
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]	
Asp	11,2	+/- 0,2	10,7	+/- 0,3	9,7	+/- 0,5	5,1	+/- 0,3	3,4	+/- 0,0	8,7	+/- 4,9
Glu	58,6	+/- 5,3	53,9	+/- 0,2	42,1	+/- 2,8	22,5	+/- 3,2	16,4	+/- 0,0	71,4	+/- 4,8
Asn	5,4	+/- 0,2	4,8	+/- 0,0	4,5	+/- 0,8	3,6	+/- 0,2	3,8	+/- 0,2	6,2	+/- 0,3
Ser	15,3	+/- 0,6	14,5	+/- 0,6	13,0	+/- 1,0	11,1	+/- 0,8	12,5	+/- 2,2	19,0	+/- 0,1
Gln	34,6	+/- 0,2	32,3	+/- 0,2	27,7	+/- 1,4	22,4	+/- 4,0	25,1	+/- 0,1	36,7	+/- 2,7
His	0,1	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0	0,0	+/- 0,0
Gly	11,2	+/- 0,4	11,1	+/- 0,1	8,1	+/- 0,6	7,2	+/- 0,5	8,4	+/- 1,9	14,9	+/- 0,7
Thr	8,1	+/- 0,3	7,6	+/- 0,1	7,5	+/- 0,2	4,0	+/- 0,1	3,5	+/- 0,2	7,6	+/- 0,3
Arg	94,8	+/- 2,9	85,8	+/- 0,8	86,1	+/- 4,1	84,2	+/- 6,8	89,5	+/- 2,3	102,8	+/- 2,2
Tyr	2,5	+/- 0,8	2,4	+/- 0,1	2,5	+/- 0,3	2,2	+/- 0,2	2,2	+/- 0,3	3,3	+/- 0,0
Ala	24,1	+/- 6,2	25,0	+/- 0,2	17,1	+/- 1,2	13,2	+/- 1,8	15,1	+/- 1,1	32,9	+/- 0,6
Trp	1,8	+/- 0,2	1,3	+/- 0,1	1,1	+/- 0,0	1,0	+/- 0,1	1,0	+/- 0,1	1,6	+/- 0,0
Met	2,2	+/- 0,0	1,7	+/- 0,0	1,6	+/- 0,2	2,5	+/- 1,8	1,4	+/- 0,0	2,3	+/- 0,0
Val	9,5	+/- 0,2	8,2	+/- 0,2	7,8	+/- 1,0	6,8	+/- 0,0	7,4	+/- 0,6	12,0	+/- 0,7
Phe	3,9	+/- 0,0	2,6	+/- 0,1	2,6	+/- 0,4	2,1	+/- 0,3	2,1	+/- 0,3	3,5	+/- 0,2
Ile	6,2	+/- 0,0	5,0	+/- 0,1	5,0	+/- 0,7	4,3	+/- 0,5	4,5	+/- 0,4	7,2	+/- 0,2
Leu	7,3	+/- 0,1	5,9	+/- 0,2	5,7	+/- 0,9	5,0	+/- 0,8	5,1	+/- 0,4	8,6	+/- 0,3
Orn	34,3	+/- 0,6	31,1	+/- 0,5	29,7	+/- 0,7	28,8	+/- 2,4	30,3	+/- 1,3	36,3	+/- 1,0
Lys	18,9	+/- 0,3	17,2	+/- 0,5	16,5	+/- 0,4	16,2	+/- 0,5	16,8	+/- 1,1	21,3	+/- 0,3
<b>Gesamt</b>	<b>331,1</b>	<b>+/- 18,2</b>	<b>303,9</b>	<b>+/- 3,8</b>	<b>271,8</b>	<b>+/- 16,8</b>	<b>226,0</b>	<b>+/- 23,8</b>	<b>231,7</b>	<b>+/- 11,4</b>	<b>375,0</b>	<b>+/- 19,0</b>

-Abhang-

**Tabelle 17** Permeabilisierungskinetik, Aminosäuren im Permeabilisat. Vor der Permeabilisierung wurden 57,8 µmol/ g BTM jeder Aminosäure zugegeben.

Inkubationszeit [min]	0			1			5			10			15			Aufschluß		
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]																	
<b>Asp</b>	66,1	+/-	0,5	63,8	+/-	0,1	53,7	+/-	0,5	31,7	+/-	9,2	17,8	+/-	9,0	71,0	+/-	0,5
<b>Glu</b>	58,9	+/-	0,0	55,2	+/-	0,8	74,4	+/-	1,6	44,9	+/-	6,6	43,7	+/-	13,7	105,8	+/-	0,0
<b>Asn</b>	65,1	+/-	0,4	66,3	+/-	1,7	56,6	+/-	1,9	42,6	+/-	7,7	29,1	+/-	5,7	68,8	+/-	0,4
<b>Ser</b>	67,9	+/-	4,6	62,8	+/-	0,5	55,6	+/-	2,8	33,0	+/-	9,2	18,7	+/-	7,3	71,8	+/-	4,6
<b>Gln</b>	63,1	+/-	0,2	61,7	+/-	1,2	85,0	+/-	18,4	54,3	+/-	6,8	48,7	+/-	6,8	77,7	+/-	1,9
<b>His</b>	63,7	+/-	1,2	65,0	+/-	1,8	57,4	+/-	0,2	58,3	+/-	0,1	60,9	+/-	2,3	67,9	+/-	7,2
<b>Gly</b>	59,3	+/-	0,6	61,9	+/-	1,4	64,5	+/-	0,6	59,9	+/-	1,2	62,3	+/-	1,1	73,3	+/-	0,6
<b>Thr</b>	68,3	+/-	1,3	64,9	+/-	1,9	63,5	+/-	0,9	65,6	+/-	1,2	63,5	+/-	2,6	64,3	+/-	1,2
<b>Arg</b>	61,9	+/-	1,0	61,3	+/-	3,1	65,3	+/-	7,3	57,8	+/-	1,4	67,4	+/-	3,7	68,3	+/-	2,3
<b>Tyr</b>	60,2	+/-	0,8	61,4	+/-	1,5	59,3	+/-	2,6	54,5	+/-	1,9	52,7	+/-	0,3	64,1	+/-	0,8
<b>Ala</b>	61,7	+/-	0,6	62,4	+/-	1,5	74,9	+/-	2,1	63,3	+/-	3,0	65,2	+/-	1,0	89,6	+/-	0,6
<b>Trp</b>	65,2	+/-	0,6	66,0	+/-	1,5	64,4	+/-	1,2	59,7	+/-	2,3	56,4	+/-	0,4	68,8	+/-	0,6
<b>Met</b>	60,5	+/-	0,5	60,5	+/-	1,1	58,2	+/-	2,1	56,0	+/-	1,1	56,2	+/-	0,9	64,6	+/-	0,5
<b>Val</b>	71,5	+/-	0,5	72,9	+/-	2,1	70,8	+/-	2,6	66,4	+/-	1,4	67,5	+/-	0,6	83,8	+/-	0,5
<b>Phe</b>	62,3	+/-	0,6	63,6	+/-	1,7	61,9	+/-	1,8	59,0	+/-	0,8	59,4	+/-	0,8	66,6	+/-	0,6
<b>Ile</b>	63,1	+/-	0,3	64,3	+/-	1,5	62,3	+/-	2,3	58,3	+/-	1,4	57,9	+/-	0,2	71,3	+/-	0,3
<b>Leu</b>	60,2	+/-	0,5	61,0	+/-	1,4	60,0	+/-	2,4	56,3	+/-	1,5	55,5	+/-	0,1	69,7	+/-	0,5
<b>Orn</b>	60,1	+/-	1,1	59,4	+/-	1,7	64,4	+/-	2,4	58,5	+/-	0,7	67,0	+/-	1,5	95,0	+/-	1,1
<b>Lys</b>	59,8	+/-	0,3	59,5	+/-	1,7	59,0	+/-	1,6	56,6	+/-	0,9	59,2	+/-	0,8	81,4	+/-	0,3
<b>Gesamt</b>	1139,1	+/-	15,3	1134,4	+/-	26,5	1152,2	+/-	53,7	980,1	+/-	57,5	949,9	+/-	58,0	1342,4	+/-	24,2

### 6.3 Dynamische Bestimmung von Aminosäureverteilungen

In den folgenden Tabellen sind die kompletten Daten der in 3.3 beschriebenen Experimente aufgeführt.

#### 6.3.1 Shift auf 10 mM L-Prolin

Tabelle 18 Gesamte Daten des *shift*-Experiments auf 10 mM L-Prolin.

t [h] nach <i>downshift</i>	0						0,5					
	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol/ g BTM}$ ]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol/ g BTM}$ ]			% vakuolär		
<b>Asp</b>	13,8	+/-	0,2	62,4	+/-	0,5	8,2	+/-	2,3	66,4	+/-	0,5
<b>Glu</b>	69,3	+/-	3,6	63,1	+/-	0,6	84,7	+/-	3,4	76,9	+/-	2,3
<b>Asn</b>	5,1	+/-	0,8	34,6	+/-	11,0	4,4	+/-	0,4	49,7	+/-	3,8
<b>Ser</b>	33,5	+/-	4,2	55,9	+/-	5,3	19,8	+/-	7,5	49,1	+/-	3,5
<b>Gln</b>	21,6	+/-	1,2	32,6	+/-	3,0	6,1	+/-	0,5	38,2	+/-	3,9
<b>His</b>	7,6	+/-	0,2	73,3	+/-	2,5	5,4	+/-	0,2	71,6	+/-	6,4
<b>Gly</b>	22,5	+/-	1,7	36,9	+/-	4,5	12,9	+/-	5,0	35,8	+/-	1,2
<b>Thr</b>	11,2	+/-	1,1	44,9	+/-	5,2	6,8	+/-	1,1	55,5	+/-	0,5
<b>Cit</b>	3,7	+/-	0,3	63,2	+/-	3,8	0,9	+/-	0,0	70,4	+/-	2,4
<b>Ala</b>	32,7	+/-	3,5	32,1	+/-	1,6	13,0	+/-	2,8	52,7	+/-	2,9
<b>Arg</b>	83,0	+/-	5,6	78,6	+/-	2,4	97,1	+/-	3,0	92,4	+/-	0,5
<b>Tyr</b>	5,8	+/-	0,5	71,1	+/-	2,6	4,0	+/-	0,5	70,7	+/-	2,5
<b>Val</b>	7,8	+/-	0,9	61,6	+/-	5,6	5,8	+/-	0,8	57,3	+/-	4,9
<b>Met</b>	1,9	+/-	0,2	68,9	+/-	10,9	1,5	+/-	0,1	50,8	+/-	9,3
<b>Trp</b>	1,4	+/-	0,1	64,0	+/-	10,3	0,8	+/-	0,1	50,6	+/-	11,0
<b>Phe</b>	4,9	+/-	0,6	52,5	+/-	7,0	3,5	+/-	0,4	66,9	+/-	6,1
<b>Ile</b>	5,5	+/-	0,7	68,1	+/-	7,0	4,6	+/-	0,6	65,1	+/-	6,2
<b>Orn</b>	143,3	+/-	8,7	76,4	+/-	4,0	138,0	+/-	6,9	90,2	+/-	2,5
<b>Leu</b>	8,4	+/-	1,2	67,0	+/-	6,0	7,7	+/-	0,9	66,8	+/-	3,6
<b>Lys</b>	31,2	+/-	0,9	78,3	+/-	3,5	40,3	+/-	0,8	87,6	+/-	3,9
<b>Pro</b>	9,4	+/-	2,3	35,4	+/-	7,0	33,3	+/-	6,1	27,7	+/-	2,5
<b>Gesamt</b>	523,6	+/-	22,4	64,5	+/-	1,3	498,7	+/-	29,2	72,6	+/-	2,9

Tabelle 18 Fortsetzung

t [h] nach downshift												
1						2						
Amino-säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	16,0	+/-	1,4	77,7	+/-	2,7	18,8	+/-	0,6	88,6	+/-	0,9
Glu	114,2	+/-	11,2	76,0	+/-	2,5	131,8	+/-	2,4	90,4	+/-	0,3
Asn	4,8	+/-	0,4	55,8	+/-	2,0	4,9	+/-	0,1	63,0	+/-	2,7
Ser	15,0	+/-	1,2	55,4	+/-	3,2	18,7	+/-	3,5	64,2	+/-	3,8
Gln	7,8	+/-	0,7	34,7	+/-	0,5	16,9	+/-	0,4	65,4	+/-	1,3
His	4,8	+/-	0,4	76,4	+/-	3,8	5,1	+/-	0,3	81,4	+/-	0,9
Gly	11,3	+/-	0,7	41,4	+/-	2,9	12,3	+/-	1,5	50,2	+/-	1,5
Thr	7,3	+/-	0,5	61,2	+/-	3,5	8,2	+/-	0,6	67,7	+/-	0,9
Cit	1,9	+/-	0,1	66,9	+/-	9,9	1,6	+/-	0,0	80,8	+/-	5,4
Ala	15,0	+/-	1,2	49,6	+/-	2,4	17,5	+/-	0,8	58,5	+/-	1,9
Arg	84,4	+/-	7,3	93,4	+/-	3,4	73,0	+/-	1,3	98,9	+/-	2,0
Tyr	4,2	+/-	0,3	78,7	+/-	2,7	5,3	+/-	0,2	85,7	+/-	0,8
Val	6,0	+/-	0,3	62,9	+/-	2,6	6,2	+/-	0,3	73,1	+/-	1,6
Met	1,7	+/-	0,0	69,9	+/-	2,5	1,4	+/-	0,0	78,4	+/-	2,5
Trp	0,9	+/-	0,1	63,0	+/-	16,0	1,1	+/-	0,1	69,2	+/-	6,8
Phe	3,6	+/-	0,1	75,3	+/-	1,6	3,7	+/-	0,2	80,1	+/-	2,0
Ile	5,0	+/-	0,2	73,8	+/-	1,1	4,9	+/-	0,2	80,1	+/-	1,5
Orn	110,7	+/-	11,8	88,1	+/-	2,2	104,0	+/-	1,9	93,0	+/-	0,5
Leu	7,7	+/-	0,4	77,1	+/-	1,8	7,4	+/-	0,3	81,1	+/-	1,6
Lys	50,3	+/-	4,7	89,4	+/-	2,4	55,2	+/-	0,9	93,8	+/-	0,6
Pro	77,5	+/-	31,6	16,3	+/-	0,5	46,3	+/-	0,7	42,1	+/-	3,3
<b>Gesamt</b>	<b>549,9</b>	<b>+/-</b>	<b>42,6</b>	<b>71,0</b>	<b>+/-</b>	<b>1,5</b>	<b>544,3</b>	<b>+/-</b>	<b>10,9</b>	<b>83,2</b>	<b>+/-</b>	<b>0,3</b>
t [h] nach downshift												
3						4						
Amino-säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	18,2	+/-	0,8	87,9	+/-	2,5	19,3	+/-	1,9	89,2	+/-	3,0
Glu	121,3	+/-	4,7	91,9	+/-	1,2	123,1	+/-	11,5	92,0	+/-	1,4
Asn	5,0	+/-	0,2	61,5	+/-	1,9	5,6	+/-	0,5	66,3	+/-	2,5
Ser	18,5	+/-	0,7	69,8	+/-	2,6	18,4	+/-	1,3	71,9	+/-	4,0
Gln	15,9	+/-	1,3	60,6	+/-	2,9	17,1	+/-	0,8	63,9	+/-	2,3
His	4,9	+/-	0,2	82,4	+/-	1,3	5,2	+/-	0,4	84,1	+/-	2,7
Gly	11,6	+/-	0,5	48,8	+/-	2,2	11,2	+/-	0,8	53,6	+/-	3,2
Thr	7,6	+/-	0,4	64,8	+/-	2,6	8,3	+/-	0,4	69,4	+/-	3,3
Cit	1,3	+/-	0,1	79,9	+/-	1,3	1,1	+/-	0,1	83,1	+/-	9,1
Ala	15,7	+/-	1,0	63,5	+/-	2,6	18,2	+/-	0,8	67,5	+/-	3,3
Arg	65,2	+/-	3,6	97,6	+/-	0,4	64,9	+/-	6,3	97,6	+/-	0,6
Tyr	6,4	+/-	0,2	86,9	+/-	1,6	7,7	+/-	0,7	89,7	+/-	2,5
Val	5,3	+/-	0,2	78,0	+/-	2,3	5,5	+/-	0,5	81,5	+/-	2,6
Met	1,3	+/-	0,1	80,1	+/-	3,9	1,5	+/-	0,1	83,8	+/-	1,7
Trp	1,2	+/-	0,1	88,3	+/-	0,5	1,4	+/-	0,1	89,8	+/-	0,8
Phe	3,3	+/-	0,2	79,8	+/-	2,1	3,6	+/-	0,3	83,3	+/-	1,7
Ile	4,1	+/-	0,2	79,3	+/-	0,7	4,3	+/-	0,4	82,1	+/-	2,9
Orn	103,9	+/-	5,0	94,0	+/-	0,6	115,8	+/-	8,2	95,2	+/-	1,5
Leu	7,0	+/-	0,3	81,2	+/-	1,2	7,5	+/-	0,7	84,7	+/-	2,4
Lys	56,7	+/-	3,3	95,6	+/-	0,4	62,8	+/-	5,8	96,2	+/-	1,4
Pro	26,7	+/-	3,3	51,9	+/-	13,8	26,0	+/-	4,9	48,7	+/-	6,0
<b>Gesamt</b>	<b>501,1</b>	<b>+/-</b>	<b>22,5</b>	<b>84,9</b>	<b>+/-</b>	<b>1,5</b>	<b>528,4</b>	<b>+/-</b>	<b>45,7</b>	<b>86,0</b>	<b>+/-</b>	<b>2,0</b>

Tabelle 18 Fortsetzung

t [h] nach downshift		6						8					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	15,7	+/-	0,8	86,5	+/-	1,5	14,6	+/-	0,5	89,0	+/-	2,4	
Glu	108,3	+/-	3,7	91,3	+/-	1,1	106,8	+/-	5,5	94,9	+/-	0,7	
Asn	6,0	+/-	0,2	63,5	+/-	2,2	6,2	+/-	0,4	71,2	+/-	1,6	
Ser	12,0	+/-	0,5	63,0	+/-	2,1	11,5	+/-	1,0	67,1	+/-	1,8	
Gln	14,6	+/-	0,9	59,5	+/-	2,4	17,5	+/-	1,2	64,9	+/-	1,2	
His	5,2	+/-	0,1	83,0	+/-	2,1	5,5	+/-	0,2	86,5	+/-	0,5	
Gly	11,0	+/-	0,6	50,7	+/-	2,3	10,3	+/-	0,7	54,3	+/-	3,1	
Thr	7,8	+/-	0,3	65,4	+/-	2,1	7,6	+/-	0,6	71,7	+/-	1,5	
Cit	0,8	+/-	0,0	78,7	+/-	4,9	0,8	+/-	0,0	76,7	+/-	5,0	
Ala	16,1	+/-	1,4	79,4	+/-	5,4	15,4	+/-	2,9	70,0	+/-	5,2	
Arg	43,8	+/-	1,0	93,9	+/-	1,5	41,3	+/-	1,7	98,1	+/-	0,2	
Tyr	7,9	+/-	0,3	89,4	+/-	2,2	8,2	+/-	0,3	92,6	+/-	1,3	
Val	5,5	+/-	0,2	74,1	+/-	2,4	5,5	+/-	0,5	78,4	+/-	1,0	
Met	1,3	+/-	0,1	83,0	+/-	2,9	1,3	+/-	0,1	85,4	+/-	2,8	
Trp	1,4	+/-	0,0	89,3	+/-	4,5	1,4	+/-	0,1	89,6	+/-	2,7	
Phe	3,6	+/-	0,2	80,6	+/-	2,4	3,5	+/-	0,3	84,2	+/-	1,8	
Ile	4,2	+/-	0,3	80,8	+/-	1,9	4,1	+/-	0,5	83,8	+/-	2,1	
Orn	152,5	+/-	5,6	94,3	+/-	1,4	182,7	+/-	12,5	96,5	+/-	0,3	
Leu	8,7	+/-	0,5	86,2	+/-	1,8	8,8	+/-	0,8	88,9	+/-	1,5	
Lys	57,1	+/-	2,5	94,9	+/-	1,2	58,6	+/-	2,0	95,8	+/-	0,9	
Pro	61,1	+/-	13,6	58,8	+/-	6,2	62,2	+/-	18,8	81,9	+/-	10,5	
<b>Gesamt</b>	<b>544,6</b>	<b>+/-</b>	<b>16,5</b>	<b>84,6</b>	<b>+/-</b>	<b>2,0</b>	<b>573,9</b>	<b>+/-</b>	<b>12,0</b>	<b>89,3</b>	<b>+/-</b>	<b>1,0</b>	
t [h] nach downshift		10						12					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	14,8	+/-	0,4	91,7	+/-	0,2	14,8	+/-	0,4	89,2	+/-	2,1	
Glu	108,4	+/-	2,4	95,9	+/-	0,1	106,7	+/-	2,9	94,4	+/-	1,7	
Asn	5,7	+/-	0,1	70,2	+/-	1,4	5,8	+/-	0,1	74,7	+/-	1,9	
Ser	14,4	+/-	0,3	74,5	+/-	0,9	14,5	+/-	0,9	75,4	+/-	0,9	
Gln	18,3	+/-	0,8	69,0	+/-	0,7	17,3	+/-	1,2	74,8	+/-	1,7	
His	5,2	+/-	0,1	88,3	+/-	0,9	5,1	+/-	0,1	86,2	+/-	2,0	
Gly	10,9	+/-	0,3	59,2	+/-	1,4	10,5	+/-	0,6	62,4	+/-	1,7	
Thr	7,8	+/-	0,2	71,6	+/-	0,9	8,2	+/-	0,3	75,0	+/-	0,7	
Cit	0,8	+/-	0,1	81,3	+/-	16,5	0,8	+/-	0,1	86,1	+/-	13,6	
Ala	12,7	+/-	0,7	68,5	+/-	1,4	12,5	+/-	0,7	70,1	+/-	4,4	
Arg	57,2	+/-	1,6	98,6	+/-	0,2	54,7	+/-	1,2	96,4	+/-	1,6	
Tyr	7,9	+/-	0,1	94,0	+/-	0,6	7,9	+/-	0,2	90,9	+/-	2,1	
Val	4,9	+/-	0,2	80,9	+/-	1,3	5,1	+/-	0,1	81,0	+/-	2,9	
Met	1,3	+/-	0,1	47,4	+/-	5,9	1,3	+/-	0,1	36,3	+/-	2,3	
Trp	1,1	+/-	0,1	75,0	+/-	6,2	1,1	+/-	0,0	68,2	+/-	3,2	
Phe	2,9	+/-	0,1	78,1	+/-	1,1	2,9	+/-	0,1	74,4	+/-	4,5	
Ile	3,6	+/-	0,1	80,2	+/-	2,4	3,6	+/-	0,1	76,6	+/-	2,0	
Orn	168,3	+/-	3,7	97,4	+/-	0,2	177,4	+/-	9,3	94,7	+/-	2,2	
Leu	6,3	+/-	0,2	84,6	+/-	1,2	6,2	+/-	0,2	80,9	+/-	3,7	
Lys	62,2	+/-	2,4	96,1	+/-	1,2	61,0	+/-	1,2	93,8	+/-	2,7	
Pro	29,3	+/-	5,3	60,7	+/-	1,5	38,7	+/-	2,5	76,0	+/-	4,1	
<b>Gesamt</b>	<b>544,0</b>	<b>+/-</b>	<b>14,7</b>	<b>90,4</b>	<b>+/-</b>	<b>0,8</b>	<b>556,1</b>	<b>+/-</b>	<b>22,3</b>	<b>89,0</b>	<b>+/-</b>	<b>2,1</b>	

Tabelle 18 Fortsetzung

t [h] nach downshift		20,5					21					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	11,8	+/-	0,3	92,9	+/-	3,7	13,8	+/-	0,8	94,3	+/-	1,0
Glu	99,4	+/-	1,4	98,8	+/-	0,2	93,7	+/-	2,2	98,6	+/-	0,2
Asn	6,2	+/-	0,6	94,2	+/-	0,5	7,7	+/-	0,3	93,6	+/-	0,9
Ser	13,4	+/-	0,5	82,0	+/-	8,7	17,1	+/-	0,5	87,8	+/-	1,3
Gln	19,2	+/-	2,4	94,5	+/-	0,4	90,4	+/-	4,4	92,7	+/-	2,0
His	5,3	+/-	0,2	93,9	+/-	1,3	8,9	+/-	0,3	95,4	+/-	0,8
Gly	11,0	+/-	1,4	77,0	+/-	5,3	13,5	+/-	0,7	80,8	+/-	2,0
Thr	8,7	+/-	0,7	90,4	+/-	3,1	11,2	+/-	0,1	90,5	+/-	1,4
Cit	0,5	+/-	0,0	74,4	+/-	14,5	1,1	+/-	0,1	88,0	+/-	5,0
Ala	11,8	+/-	0,3	88,0	+/-	1,2	29,7	+/-	3,3	83,0	+/-	3,6
Arg	48,8	+/-	2,1	99,2	+/-	0,4	50,7	+/-	5,4	98,9	+/-	0,2
Tyr	7,0	+/-	0,1	95,4	+/-	2,2	14,4	+/-	1,0	97,9	+/-	0,2
Val	5,5	+/-	0,5	90,5	+/-	3,4	8,5	+/-	0,4	92,3	+/-	1,2
Met	1,3	+/-	0,1	69,1	+/-	11,5	1,6	+/-	0,0	81,4	+/-	6,1
Trp	1,2	+/-	0,0	81,3	+/-	11,8	3,1	+/-	0,2	93,8	+/-	3,3
Phe	2,7	+/-	0,5	84,9	+/-	5,0	4,7	+/-	0,4	89,5	+/-	2,6
Ile	3,5	+/-	0,6	85,9	+/-	4,1	5,2	+/-	0,1	89,2	+/-	1,2
Orn	175,1	+/-	26,6	98,4	+/-	0,5	192,4	+/-	14,2	98,4	+/-	0,3
Leu	5,9	+/-	1,0	88,6	+/-	3,4	8,5	+/-	0,5	93,1	+/-	1,5
Lys	63,6	+/-	4,2	98,5	+/-	0,8	60,3	+/-	3,5	98,7	+/-	0,5
Pro	18,6	+/-	3,9	67,2	+/-	6,8	8,5	+/-	0,7	85,5	+/-	2,8
<b>Gesamt</b>	<b>520,5</b>	<b>+/-</b>	<b>30,9</b>	<b>95,8</b>	<b>+/-</b>	<b>1,2</b>	<b>645,0</b>	<b>+/-</b>	<b>32,9</b>	<b>95,7</b>	<b>+/-</b>	<b>0,6</b>
t [h] nach downshift		21,5					22,5					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	10,8	+/-	0,1	90,4	+/-	1,3	12,1	+/-	0,3	91,7	+/-	0,8
Glu	105,8	+/-	0,8	97,2	+/-	0,3	104,7	+/-	2,3	96,8	+/-	0,2
Asn	7,6	+/-	0,2	84,3	+/-	2,6	7,4	+/-	0,3	82,8	+/-	1,6
Ser	22,6	+/-	0,4	82,4	+/-	1,5	23,8	+/-	0,7	82,5	+/-	2,0
Gln	118,6	+/-	1,4	91,8	+/-	2,7	92,3	+/-	4,6	89,2	+/-	0,4
His	10,0	+/-	0,2	94,7	+/-	0,2	9,3	+/-	0,2	92,8	+/-	0,3
Gly	14,8	+/-	0,6	70,1	+/-	3,1	16,6	+/-	0,8	71,5	+/-	3,6
Thr	13,2	+/-	0,4	83,8	+/-	2,4	15,2	+/-	0,5	82,3	+/-	1,7
Cit	1,5	+/-	0,1	100,0	+/-	0,0	2,4	+/-	0,1	94,1	+/-	8,3
Ala	24,8	+/-	0,3	76,6	+/-	4,8	24,7	+/-	1,0	72,2	+/-	4,5
Arg	54,5	+/-	2,5	98,7	+/-	0,2	58,7	+/-	0,8	96,5	+/-	0,3
Tyr	14,5	+/-	0,5	96,1	+/-	0,4	14,9	+/-	0,2	94,8	+/-	0,1
Val	8,3	+/-	0,3	89,2	+/-	0,6	8,8	+/-	0,3	89,4	+/-	0,8
Met	1,6	+/-	0,1	83,8	+/-	3,3	1,8	+/-	0,1	86,3	+/-	3,7
Trp	3,5	+/-	0,3	93,4	+/-	3,4	3,4	+/-	0,1	90,4	+/-	7,2
Phe	4,8	+/-	0,1	81,7	+/-	1,5	5,0	+/-	0,2	84,1	+/-	0,5
Ile	5,2	+/-	0,1	89,9	+/-	0,8	5,5	+/-	0,2	90,9	+/-	0,2
Orn	279,9	+/-	12,0	97,9	+/-	0,4	288,0	+/-	4,9	93,7	+/-	0,6
Leu	9,0	+/-	0,1	90,3	+/-	0,9	10,0	+/-	0,3	91,0	+/-	0,0
Lys	48,0	+/-	2,6	98,0	+/-	0,3	38,2	+/-	1,4	95,3	+/-	0,9
Pro	6,7	+/-	1,2	84,7	+/-	6,8	6,0	+/-	0,3	91,8	+/-	0,2
<b>Gesamt</b>	<b>765,7</b>	<b>+/-</b>	<b>17,1</b>	<b>94,5</b>	<b>+/-</b>	<b>0,6</b>	<b>748,8</b>	<b>+/-</b>	<b>10,0</b>	<b>91,8</b>	<b>+/-</b>	<b>0,1</b>

Tabelle 18 Fortsetzung

t [h] nach downshift		24,5					26,5					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	14,6	+/-	0,8	86,1	+/-	2,8	14,3	+/-	0,5	88,3	+/-	0,1
Glu	96,8	+/-	2,6	91,6	+/-	0,4	80,6	+/-	0,8	92,4	+/-	0,4
Asn	6,1	+/-	0,2	69,9	+/-	1,5	7,4	+/-	0,1	82,0	+/-	3,0
Ser	26,7	+/-	7,5	73,2	+/-	0,6	21,9	+/-	0,2	82,4	+/-	1,5
Gln	60,0	+/-	6,1	70,8	+/-	2,9	30,5	+/-	0,6	71,9	+/-	4,1
His	8,9	+/-	0,7	87,8	+/-	2,1	8,6	+/-	0,4	89,8	+/-	0,1
Gly	21,9	+/-	2,6	57,5	+/-	0,5	19,3	+/-	0,7	69,7	+/-	3,6
Thr	17,9	+/-	0,3	69,9	+/-	2,0	18,8	+/-	0,6	79,7	+/-	1,9
Cit	4,2	+/-	0,2	84,9	+/-	1,2	5,6	+/-	0,6	91,4	+/-	0,5
Ala	34,6	+/-	0,9	51,1	+/-	3,7	36,3	+/-	0,8	58,3	+/-	0,0
Arg	79,6	+/-	5,2	91,3	+/-	1,7	95,0	+/-	3,1	89,2	+/-	0,8
Tyr	10,9	+/-	0,8	90,6	+/-	2,1	7,7	+/-	0,2	91,4	+/-	0,1
Val	10,9	+/-	0,1	79,2	+/-	1,6	12,0	+/-	0,4	87,0	+/-	1,4
Met	3,1	+/-	0,4	80,5	+/-	7,6	3,7	+/-	0,1	91,5	+/-	0,8
Trp	2,2	+/-	0,1	78,8	+/-	6,9	2,1	+/-	0,1	86,4	+/-	1,5
Phe	5,1	+/-	0,5	76,0	+/-	4,7	5,9	+/-	0,2	83,7	+/-	1,0
Ile	6,1	+/-	0,7	81,6	+/-	4,3	7,9	+/-	0,3	88,9	+/-	0,5
Orn	350,2	+/-	19,6	90,7	+/-	0,0	313,8	+/-	7,5	85,0	+/-	1,6
Leu	12,0	+/-	1,2	85,3	+/-	3,0	14,1	+/-	0,3	88,8	+/-	0,5
Lys	38,1	+/-	2,7	89,8	+/-	2,2	40,4	+/-	0,4	88,0	+/-	0,7
Pro	1,4	+/-	0,1	95,2	+/-	3,8	1,4	+/-	0,2	96,7	+/-	0,3
<b>Gesamt</b>	<b>811,3</b>	<b>+/-</b>	<b>41,1</b>	<b>85,5</b>	<b>+/-</b>	<b>0,0</b>	<b>747,3</b>	<b>+/-</b>	<b>7,9</b>	<b>84,3</b>	<b>+/-</b>	<b>0,3</b>
t [h] nach downshift		28,5					48,5					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	35,2	+/-	0,9	94,8	+/-	0,5	28,2	+/-	2,1	97,0	+/-	0,3
Glu	104,9	+/-	6,2	97,2	+/-	0,3	278,5	+/-	3,0	98,5	+/-	0,1
Asn	12,5	+/-	3,9	78,2	+/-	2,7	5,8	+/-	2,3	62,9	+/-	4,4
Ser	24,8	+/-	3,6	86,4	+/-	1,0	19,5	+/-	0,3	85,7	+/-	1,8
Gln	23,6	+/-	5,9	80,0	+/-	2,6	144,4	+/-	8,6	87,4	+/-	1,4
His	13,6	+/-	1,1	95,7	+/-	0,4	20,8	+/-	0,5	96,6	+/-	0,3
Gly	19,1	+/-	2,5	70,1	+/-	2,3	11,6	+/-	0,2	78,7	+/-	2,6
Thr	20,8	+/-	2,6	76,1	+/-	2,9	13,3	+/-	0,3	81,3	+/-	2,9
Cit	9,2	+/-	0,4	95,2	+/-	0,4	3,9	+/-	0,2	94,1	+/-	0,7
Ala	87,0	+/-	2,4	57,1	+/-	7,5	21,2	+/-	0,5	74,3	+/-	3,0
Arg	171,9	+/-	5,9	94,4	+/-	0,6	179,6	+/-	7,8	96,1	+/-	0,5
Tyr	17,0	+/-	1,9	94,7	+/-	0,3	6,9	+/-	0,1	93,8	+/-	0,7
Val	17,4	+/-	3,3	88,3	+/-	0,6	7,0	+/-	0,3	88,5	+/-	1,6
Met	4,0	+/-	0,7	86,6	+/-	5,6	1,8	+/-	0,1	82,0	+/-	2,8
Trp	2,2	+/-	0,5	85,6	+/-	8,0	0,8	+/-	0,0	83,3	+/-	3,4
Phe	8,8	+/-	1,6	87,6	+/-	2,4	4,6	+/-	0,3	86,7	+/-	1,4
Ile	11,9	+/-	2,7	90,2	+/-	1,7	25,1	+/-	1,2	94,7	+/-	0,5
Orn	205,8	+/-	5,1	94,2	+/-	0,6	196,1	+/-	7,6	96,1	+/-	0,3
Leu	19,2	+/-	4,1	90,2	+/-	1,4	7,4	+/-	0,5	91,1	+/-	1,2
Lys	38,4	+/-	5,1	93,4	+/-	1,6	33,2	+/-	1,2	94,7	+/-	0,7
Pro	6,4	+/-	1,1	68,9	+/-	16,3	12,0	+/-	2,2	90,3	+/-	2,2
<b>Gesamt</b>	<b>853,9</b>	<b>+/-</b>	<b>57,0</b>	<b>89,4</b>	<b>+/-</b>	<b>0,9</b>	<b>1022</b>	<b>+/-</b>	<b>16,7</b>	<b>93,8</b>	<b>+/-</b>	<b>0,5</b>

### 6.3.2 Shift auf Medium ohne Stickstoffquelle

Tabelle 19 Gesamte Daten des *shift*-Experiments auf CBSS-Medium ohne Stickstoffquelle.

t [h] nach <i>downshift</i>	0						0,5					
	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol/ g BTM}$ ]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol/ g BTM}$ ]			% vakuolär		
<b>Asp</b>	15,2	+/-	0,2	80,2	+/-	0,5	4,6	+/-	0,3	71,4	+/-	6,3
<b>Glu</b>	85,4	+/-	1,5	89,8	+/-	0,8	62,2	+/-	2,2	85,0	+/-	1,3
<b>Asn</b>	6,6	+/-	0,4	57,2	+/-	1,2	3,5	+/-	0,2	53,8	+/-	8,7
<b>Ser</b>	18,9	+/-	0,4	69,5	+/-	5,1	13,2	+/-	0,2	64,9	+/-	9,7
<b>Gln</b>	18,2	+/-	0,3	61,6	+/-	2,3	3,5	+/-	0,4	50,1	+/-	8,8
<b>His</b>	12,0	+/-	0,7	45,6	+/-	6,8	6,8	+/-	0,2	41,7	+/-	13,9
<b>Gly</b>	4,9	+/-	0,1	93,7	+/-	1,5	3,1	+/-	0,1	86,5	+/-	1,9
<b>Thr</b>	11,5	+/-	0,4	57,5	+/-	1,0	5,3	+/-	0,3	55,2	+/-	6,8
<b>Cit</b>	2,0	+/-	0,2	42,1	+/-	5,4	1,4	+/-	0,1	32,4	+/-	6,8
<b>Arg</b>	65,6	+/-	0,7	87,4	+/-	1,6	64,1	+/-	1,7	92,4	+/-	0,2
<b>Ala</b>	26,8	+/-	0,8	52,2	+/-	3,2	9,1	+/-	0,4	66,7	+/-	7,8
<b>Tyr</b>	6,2	+/-	0,2	76,9	+/-	1,0	3,2	+/-	0,1	69,5	+/-	4,8
<b>Val</b>	9,1	+/-	0,4	73,0	+/-	0,6	5,2	+/-	0,5	69,1	+/-	5,0
<b>Met</b>	2,1	+/-	0,2	82,3	+/-	1,2	1,4	+/-	0,1	82,8	+/-	8,3
<b>Trp</b>	1,7	+/-	0,1	33,6	+/-	1,0	0,6	+/-	0,1	88,9	+/-	19,2
<b>Phe</b>	6,3	+/-	0,4	71,1	+/-	1,7	3,8	+/-	0,3	71,7	+/-	4,1
<b>Ile</b>	4,9	+/-	0,3	71,1	+/-	0,6	3,1	+/-	0,2	72,8	+/-	4,4
<b>Orn</b>	9,1	+/-	0,5	76,4	+/-	0,6	6,0	+/-	0,4	71,5	+/-	3,6
<b>Leu</b>	148,9	+/-	7,2	89,1	+/-	0,5	146,6	+/-	3,4	94,2	+/-	0,3
<b>Lys</b>	44,4	+/-	1,9	91,9	+/-	0,3	42,7	+/-	0,6	88,1	+/-	8,5
<b>Pro</b>	7,4	+/-	0,8	77,1	+/-	20,0	11,9	+/-	0,6	36,4	+/-	8,2
<b>Gesamt</b>	506,8	+/-	13,4	81,0	+/-	0,1	401,4	+/-	8,0	80,5	+/-	2,7

Tabelle 19 Fortsetzung

t [h] nach downshift		1						2					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	8,8	+/-	0,3	80,6	+/-	1,2	12,4	+/-	1,7	81,5	+/-	2,7	
Glu	56,7	+/-	0,6	81,3	+/-	0,6	53,6	+/-	10,2	79,2	+/-	2,4	
Asn	3,4	+/-	0,3	60,5	+/-	0,5	2,7	+/-	1,9	64,6	+/-	3,3	
Ser	13,0	+/-	0,2	56,8	+/-	0,6	10,8	+/-	3,5	61,1	+/-	6,1	
Gln	3,7	+/-	0,1	49,0	+/-	2,0	3,1	+/-	2,5	50,4	+/-	5,7	
His	10,0	+/-	0,5	42,9	+/-	0,4	11,9	+/-	0,2	57,2	+/-	3,6	
Gly	3,7	+/-	0,1	81,3	+/-	3,1	3,8	+/-	0,2	80,1	+/-	1,2	
Thr	6,2	+/-	0,1	68,4	+/-	0,7	7,0	+/-	0,3	73,1	+/-	1,5	
Cit	1,3	+/-	0,1	75,7	+/-	0,0	1,1	+/-	0,1	77,3	+/-	2,6	
Arg	58,6	+/-	2,2	96,4	+/-	1,0	45,4	+/-	2,7	97,5	+/-	0,2	
Ala	11,5	+/-	0,4	57,6	+/-	3,8	13,9	+/-	1,3	57,2	+/-	2,6	
Tyr	3,9	+/-	0,0	82,8	+/-	0,4	4,5	+/-	0,4	84,5	+/-	1,1	
Val	6,2	+/-	0,2	73,3	+/-	1,4	7,6	+/-	0,7	75,6	+/-	1,6	
Met	1,6	+/-	0,1	77,7	+/-	13,2	1,4	+/-	0,3	84,2	+/-	0,6	
Trp	0,8	+/-	0,0	83,0	+/-	1,1	0,8	+/-	0,1	84,8	+/-	5,5	
Phe	4,6	+/-	0,2	77,5	+/-	1,8	4,8	+/-	0,7	82,3	+/-	0,8	
Ile	3,6	+/-	0,2	78,5	+/-	2,3	3,8	+/-	0,5	83,5	+/-	2,2	
Orn	7,3	+/-	0,3	75,1	+/-	1,8	8,5	+/-	2,8	78,1	+/-	4,1	
Leu	119,3	+/-	3,1	93,5	+/-	0,5	96,4	+/-	4,7	93,4	+/-	2,9	
Lys	51,3	+/-	1,4	94,1	+/-	1,0	59,4	+/-	1,4	95,4	+/-	0,7	
Pro	10,0	+/-	0,7	28,9	+/-	3,5	3,2	+/-	1,7	45,5	+/-	6,2	
<b>Gesamt</b>	<b>385,5</b>	<b>+/-</b>	<b>7,1</b>	<b>82,1</b>	<b>+/-</b>	<b>0,5</b>	<b>356,1</b>	<b>+/-</b>	<b>33,7</b>	<b>82,0</b>	<b>+/-</b>	<b>1,2</b>	
t [h] nach downshift		3						4					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	15,2	+/-	1,4	84,2	+/-	1,7	15,3	+/-	1,5	89,5	+/-	2,7	
Glu	73,9	+/-	8,7	89,2	+/-	0,8	77,1	+/-	1,3	93,9	+/-	2,0	
Asn	5,2	+/-	0,5	62,7	+/-	1,1	4,3	+/-	0,9	75,3	+/-	3,0	
Ser	15,2	+/-	0,9	61,9	+/-	1,3	16,5	+/-	0,3	73,0	+/-	2,6	
Gln	7,4	+/-	0,6	62,2	+/-	1,3	6,9	+/-	2,7	68,5	+/-	14,7	
His	11,7	+/-	1,6	52,5	+/-	2,4	12,8	+/-	3,8	71,4	+/-	2,9	
Gly	4,2	+/-	0,5	74,8	+/-	3,5	4,3	+/-	0,4	81,7	+/-	3,7	
Thr	7,0	+/-	0,8	66,9	+/-	2,3	6,2	+/-	1,4	77,4	+/-	3,0	
Cit	0,7	+/-	0,0	79,0	+/-	5,8	0,5	+/-	0,1	82,2	+/-	2,1	
Ala	42,2	+/-	4,5	97,3	+/-	0,8	35,0	+/-	2,4	96,7	+/-	1,5	
Arg	14,3	+/-	1,2	49,3	+/-	2,9	12,1	+/-	1,3	62,7	+/-	3,8	
Tyr	5,1	+/-	0,5	79,5	+/-	12,9	5,7	+/-	0,2	89,9	+/-	2,6	
Val	7,2	+/-	0,7	76,1	+/-	1,1	6,5	+/-	0,9	83,2	+/-	2,6	
Met	1,7	+/-	0,2	85,5	+/-	2,1	1,5	+/-	0,2	85,5	+/-	3,3	
Trp	1,0	+/-	0,1	83,3	+/-	3,0	0,8	+/-	0,2	89,4	+/-	0,4	
Phe	5,0	+/-	0,5	82,1	+/-	0,8	4,8	+/-	0,7	85,6	+/-	3,2	
Ile	4,0	+/-	0,5	81,6	+/-	3,2	3,8	+/-	0,6	86,5	+/-	2,9	
Orn	8,5	+/-	0,8	81,4	+/-	1,7	8,2	+/-	1,1	84,6	+/-	3,2	
Leu	86,2	+/-	6,8	95,4	+/-	1,2	76,5	+/-	3,4	95,4	+/-	1,6	
Lys	64,5	+/-	6,3	96,1	+/-	0,6	81,8	+/-	12,7	96,1	+/-	1,8	
Pro	6,9	+/-	4,4	38,1	+/-	5,6	2,3	+/-	0,4	55,8	+/-	4,4	
<b>Gesamt</b>	<b>387,1</b>	<b>+/-</b>	<b>32,5</b>	<b>84,4</b>	<b>+/-</b>	<b>1,1</b>	<b>383,5</b>	<b>+/-</b>	<b>3,3</b>	<b>89,1</b>	<b>+/-</b>	<b>2,3</b>	

Tabelle 19 Fortsetzung

t [h] nach downshift		6						8					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	13,7	+/-	0,4	89,2	+/-	1,3	12,9	+/-	0,1	90,9	+/-	0,9	
Glu	81,0	+/-	1,1	96,9	+/-	0,4	73,5	+/-	0,5	97,5	+/-	0,5	
Asn	5,6	+/-	0,1	82,4	+/-	2,9	5,3	+/-	0,3	90,0	+/-	1,3	
Ser	16,1	+/-	0,2	76,1	+/-	2,0	15,1	+/-	0,8	81,9	+/-	1,5	
Gln	7,3	+/-	0,2	87,1	+/-	2,9	6,7	+/-	0,3	90,3	+/-	1,2	
His	14,3	+/-	0,5	73,7	+/-	2,7	13,5	+/-	0,5	79,8	+/-	1,1	
Gly	5,0	+/-	0,1	88,8	+/-	2,5	4,6	+/-	0,0	88,6	+/-	0,7	
Thr	6,8	+/-	0,1	81,4	+/-	2,7	6,5	+/-	0,2	86,0	+/-	1,4	
Cit	0,9	+/-	0,0	77,3	+/-	4,8	0,9	+/-	0,0	74,6	+/-	4,8	
Arg	29,4	+/-	0,4	98,0	+/-	0,3	22,8	+/-	0,3	98,2	+/-	0,6	
Ala	10,7	+/-	0,2	72,0	+/-	3,8	9,6	+/-	0,6	82,8	+/-	1,5	
Tyr	6,2	+/-	0,1	91,8	+/-	1,6	5,8	+/-	0,1	93,9	+/-	0,4	
Val	6,0	+/-	0,0	87,4	+/-	1,4	5,7	+/-	0,2	90,8	+/-	1,8	
Met	1,9	+/-	0,0	86,3	+/-	1,3	1,8	+/-	0,1	86,6	+/-	8,0	
Trp	1,3	+/-	0,1	88,8	+/-	0,8	1,2	+/-	0,0	89,5	+/-	4,6	
Phe	4,7	+/-	0,0	88,0	+/-	2,0	4,4	+/-	0,2	89,6	+/-	1,9	
Ile	4,1	+/-	0,2	87,4	+/-	2,3	3,9	+/-	0,3	90,0	+/-	2,3	
Orn	7,7	+/-	0,1	87,0	+/-	1,2	7,4	+/-	0,3	89,1	+/-	2,4	
Leu	69,9	+/-	0,9	95,3	+/-	0,7	61,9	+/-	0,5	96,2	+/-	1,1	
Lys	68,9	+/-	1,0	99,0	+/-	0,3	67,4	+/-	1,4	98,9	+/-	0,5	
Pro	4,0	+/-	0,5	69,5	+/-	3,2	4,1	+/-	0,0	80,0	+/-	3,4	
<b>Gesamt</b>	<b>365,4</b>	<b>+/-</b>	<b>4,7</b>	<b>92,0</b>	<b>+/-</b>	<b>1,1</b>	<b>336,8</b>	<b>+/-</b>	<b>2,1</b>	<b>93,8</b>	<b>+/-</b>	<b>0,9</b>	
t [h] nach downshift		8,5						9					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	12,3	+/-	0,7	87,6	+/-	0,7	9,5	+/-	0,3	89,6	+/-	0,7	
Glu	81,2	+/-	5,0	96,3	+/-	0,1	89,1	+/-	2,2	95,7	+/-	0,1	
Asn	6,1	+/-	0,5	77,6	+/-	0,9	5,2	+/-	0,8	74,8	+/-	0,8	
Ser	15,6	+/-	1,1	77,8	+/-	3,4	13,8	+/-	2,6	73,1	+/-	0,4	
Gln	52,6	+/-	3,6	82,8	+/-	0,3	45,3	+/-	9,3	85,7	+/-	11,0	
His	12,6	+/-	1,1	69,9	+/-	2,5	14,5	+/-	0,9	62,4	+/-	1,8	
Gly	4,9	+/-	0,3	90,5	+/-	0,9	5,1	+/-	0,1	97,0	+/-	5,2	
Thr	7,4	+/-	0,7	80,6	+/-	1,1	8,8	+/-	0,2	79,2	+/-	0,4	
Cit	0,9	+/-	0,1	81,3	+/-	9,2	1,5	+/-	0,1	85,4	+/-	1,1	
Arg	26,5	+/-	1,7	97,4	+/-	0,5	30,3	+/-	0,5	97,8	+/-	0,4	
Ala	22,1	+/-	2,0	61,4	+/-	0,6	23,9	+/-	0,6	58,2	+/-	0,8	
Tyr	8,7	+/-	0,5	94,1	+/-	0,3	8,9	+/-	0,1	95,5	+/-	2,4	
Val	7,5	+/-	0,6	76,7	+/-	0,8	6,9	+/-	0,2	76,6	+/-	1,1	
Met	1,6	+/-	0,1	72,5	+/-	1,9	1,4	+/-	0,2	73,0	+/-	3,5	
Trp	1,9	+/-	0,1	90,9	+/-	0,3	2,0	+/-	0,0	93,5	+/-	1,9	
Phe	5,0	+/-	0,5	87,2	+/-	0,3	4,4	+/-	0,5	88,3	+/-	0,5	
Ile	4,6	+/-	0,4	81,8	+/-	1,6	4,2	+/-	0,2	84,0	+/-	0,7	
Orn	7,8	+/-	0,7	87,3	+/-	0,8	6,7	+/-	0,8	88,8	+/-	0,1	
Leu	108,3	+/-	6,8	97,9	+/-	0,2	140,3	+/-	2,4	98,2	+/-	0,2	
Lys	69,8	+/-	4,3	99,1	+/-	0,2	62,4	+/-	2,7	99,1	+/-	0,3	
Pro	3,6	+/-	0,2	63,5	+/-	3,1	2,5	+/-	0,5	53,6	+/-	2,7	
<b>Gesamt</b>	<b>461,7</b>	<b>+/-</b>	<b>29,1</b>	<b>89,8</b>	<b>+/-</b>	<b>0,1</b>	<b>486,7</b>	<b>+/-</b>	<b>11,7</b>	<b>89,4</b>	<b>+/-</b>	<b>0,2</b>	

Tabelle 19 Fortsetzung

t [h] nach downshift		10						11					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	11,6	+/-	0,9	92,6	+/-	0,5	12,3	+/-	0,4	92,3	+/-	0,3	
Glu	91,5	+/-	1,1	97,3	+/-	0,1	86,0	+/-	1,1	95,2	+/-	0,1	
Asn	5,4	+/-	0,2	79,9	+/-	1,6	5,2	+/-	0,3	79,1	+/-	2,0	
Ser	19,9	+/-	0,4	80,5	+/-	1,5	19,4	+/-	0,4	78,4	+/-	1,0	
Gln	58,1	+/-	0,2	86,6	+/-	1,2	38,9	+/-	1,2	79,6	+/-	1,5	
His	13,9	+/-	0,8	61,7	+/-	1,7	15,9	+/-	0,6	58,3	+/-	9,8	
Gly	6,5	+/-	0,2	97,4	+/-	4,5	6,7	+/-	0,2	92,9	+/-	1,7	
Thr	10,4	+/-	0,2	79,8	+/-	1,3	11,5	+/-	0,3	77,9	+/-	1,1	
Cit	2,9	+/-	0,1	92,3	+/-	1,0	3,7	+/-	0,1	93,2	+/-	0,5	
Arg	54,8	+/-	1,2	98,0	+/-	0,7	81,4	+/-	0,6	97,7	+/-	0,4	
Ala	24,0	+/-	0,5	68,7	+/-	2,7	27,1	+/-	0,3	63,3	+/-	1,3	
Tyr	8,4	+/-	0,1	93,6	+/-	0,9	7,4	+/-	0,2	92,3	+/-	0,3	
Val	6,8	+/-	0,3	86,0	+/-	0,2	7,5	+/-	0,2	86,6	+/-	0,8	
Met	1,5	+/-	0,1	82,1	+/-	3,1	1,8	+/-	0,1	90,0	+/-	3,3	
Trp	1,9	+/-	0,0	90,5	+/-	1,4	1,6	+/-	0,1	91,2	+/-	0,4	
Phe	4,6	+/-	0,2	89,6	+/-	1,0	5,2	+/-	0,2	89,6	+/-	0,4	
Ile	3,9	+/-	0,2	86,2	+/-	1,3	4,3	+/-	0,1	88,3	+/-	0,6	
Orn	7,3	+/-	0,3	88,2	+/-	0,5	8,2	+/-	0,3	89,0	+/-	0,2	
Leu	207,0	+/-	4,4	96,6	+/-	0,9	227,1	+/-	6,0	95,5	+/-	0,9	
Lys	43,9	+/-	0,3	97,1	+/-	0,1	39,1	+/-	0,4	97,1	+/-	0,5	
Pro	2,6	+/-	0,1	71,5	+/-	3,6	2,9	+/-	0,0	75,8	+/-	3,6	
<b>Gesamt</b>	<b>586,9</b>	<b>+/-</b>	<b>6,0</b>	<b>92,3</b>	<b>+/-</b>	<b>0,2</b>	<b>613,0</b>	<b>+/-</b>	<b>10,6</b>	<b>90,6</b>	<b>+/-</b>	<b>1,1</b>	
t [h] nach downshift		12						14					
Amino- säure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			
Asp	15,1	+/-	0,7	84,1	+/-	1,8	15,7	+/-	1,6	82,8	+/-	0,7	
Glu	101,7	+/-	3,2	92,3	+/-	0,2	92,8	+/-	5,7	81,7	+/-	0,0	
Asn	5,6	+/-	0,5	72,0	+/-	0,7	6,1	+/-	0,8	64,0	+/-	2,4	
Ser	20,3	+/-	1,0	70,6	+/-	0,9	20,0	+/-	1,9	67,4	+/-	4,5	
Gln	30,8	+/-	1,2	52,0	+/-	1,1	27,9	+/-	2,1	46,6	+/-	1,6	
His	15,8	+/-	1,2	40,8	+/-	0,7	16,4	+/-	1,6	48,4	+/-	2,1	
Gly	8,8	+/-	1,3	100,0	+/-	0,0	8,7	+/-	1,1	70,1	+/-	1,4	
Thr	14,0	+/-	0,7	68,1	+/-	0,5	15,4	+/-	1,5	59,0	+/-	1,7	
Cit	5,5	+/-	0,3	92,8	+/-	0,9	5,8	+/-	0,2	87,9	+/-	0,1	
Arg	72,6	+/-	2,6	95,7	+/-	0,4	93,2	+/-	15,0	90,6	+/-	0,7	
Ala	28,8	+/-	1,2	49,7	+/-	0,3	28,0	+/-	2,8	44,3	+/-	2,4	
Tyr	7,3	+/-	0,4	91,2	+/-	0,8	6,4	+/-	0,9	87,6	+/-	0,8	
Val	8,2	+/-	0,5	78,0	+/-	0,6	8,6	+/-	1,1	75,2	+/-	1,3	
Met	2,1	+/-	0,1	82,5	+/-	1,7	2,2	+/-	0,3	88,9	+/-	0,2	
Trp	1,5	+/-	0,1	90,2	+/-	2,5	1,3	+/-	0,1	89,7	+/-	0,4	
Phe	3,9	+/-	0,2	84,1	+/-	1,3	4,0	+/-	0,6	88,6	+/-	1,1	
Ile	5,4	+/-	0,4	81,5	+/-	1,8	5,8	+/-	0,9	83,8	+/-	1,5	
Orn	9,0	+/-	0,6	83,0	+/-	1,5	9,5	+/-	1,5	87,8	+/-	1,3	
Leu	156,5	+/-	1,2	94,7	+/-	0,3	107,7	+/-	6,7	86,7	+/-	2,7	
Lys	37,0	+/-	1,3	93,4	+/-	0,1	38,4	+/-	3,7	90,1	+/-	0,8	
Pro	3,0	+/-	0,4	46,4	+/-	3,5	2,9	+/-	0,5	43,9	+/-	0,5	
<b>Gesamt</b>	<b>552,7</b>	<b>+/-</b>	<b>17,7</b>	<b>87,1</b>	<b>+/-</b>	<b>0,5</b>	<b>516,6</b>	<b>+/-</b>	<b>49,5</b>	<b>77,8</b>	<b>+/-</b>	<b>0,4</b>	

### 6.3.3 Dynamische Studien der Deletionsmutante ME 020

In den folgenden Tabellen sind die Bestimmungen aller Aminosäurepools nach dem in 3.3.3 beschriebenen Experiment aufgeführt. Die angegebenen spezifischen Konzentrationen sind als Summe der unabhängig bestimmten cytosolischen und vakuolären Gehalte angegeben. Dabei ist zu beachten, daß Glutaminsäure durch den metabolen Abbau meist etwa 20-35 % unterbestimmt ist.

Tabelle 20 A. Gesamte Daten eines *downshift*-Experiments mit der Deletionsmutante ME 020 bei OD<sub>600</sub>=1,0.

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach <i>downshift</i> [h]	0											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [μmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [μmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	10,5	+/-	0,7	57,5	+/-	4,9	6,7	+/-	0,5	58,5	+/-	6,4
Glu	47,7	+/-	1,3	60,0	+/-	4,5	32,5	+/-	4,2	54,0	+/-	8,4
Asn	4,9	+/-	0,1	54,7	+/-	1,5	4,0	+/-	0,0	52,0	+/-	5,4
Ser	28,1	+/-	3,1	56,1	+/-	2,4	18,7	+/-	1,4	56,4	+/-	5,1
Gln	39,6	+/-	4,6	62,3	+/-	3,1	28,7	+/-	3,9	55,2	+/-	3,2
His	7,8	+/-	0,9	76,7	+/-	2,4	5,5	+/-	0,4	73,4	+/-	0,5
Gly	16,1	+/-	0,9	49,1	+/-	1,4	12,9	+/-	0,7	42,6	+/-	4,5
Thr	12,6	+/-	0,5	60,9	+/-	1,9	10,0	+/-	0,6	57,4	+/-	3,8
Cit	4,9	+/-	1,6	68,4	+/-	3,3	2,3	+/-	0,6	86,1	+/-	5,9
Arg	85,3	+/-	0,7	88,2	+/-	2,2	75,5	+/-	6,3	81,7	+/-	1,3
Ala	29,3	+/-	9,7	45,4	+/-	1,9	25,4	+/-	2,0	36,9	+/-	2,5
Tyr	2,0	+/-	0,1	77,9	+/-	4,1	1,6	+/-	0,1	69,4	+/-	1,7
Val	7,8	+/-	0,5	68,4	+/-	3,0	6,0	+/-	0,1	63,5	+/-	3,8
Met	1,8	+/-	0,2	70,1	+/-	4,6	1,6	+/-	0,1	63,0	+/-	6,1
Trp	0,5	+/-	0,0	72,1	+/-	5,2	0,5	+/-	0,1	74,5	+/-	7,0
Phe	2,4	+/-	0,2	66,0	+/-	6,2	2,2	+/-	0,2	69,1	+/-	3,2
Ile	3,8	+/-	0,0	71,2	+/-	3,1	3,5	+/-	0,2	68,5	+/-	1,1
Orn	31,8	+/-	4,0	83,1	+/-	2,1	27,5	+/-	2,9	74,2	+/-	3,6
Leu	4,6	+/-	0,1	73,0	+/-	3,4	4,3	+/-	0,3	70,5	+/-	1,5
Lys	16,2	+/-	0,9	89,5	+/-	1,3	14,3	+/-	0,8	78,5	+/-	4,2
Pro	2,3	+/-	0,3	53,0	+/-	0,7	1,6	+/-	0,3	22,6	+/-	2,1
<b>Gesamt</b>	360,9	+/-	26,1	69,3	+/-	2,3	285,0	+/-	19,2	64,3	+/-	1,6

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	0,5											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	2,8	+/-	0,6	72,0	+/-	2,2	2,7	+/-	0,1	65,9	+/-	1,3
Glu	16,1	+/-	3,3	44,5	+/-	4,0	14,9	+/-	2,2	46,1	+/-	3,5
Asn	3,5	+/-	0,6	62,2	+/-	3,3	2,9	+/-	0,2	64,9	+/-	3,9
Ser	35,4	+/-	6,2	32,0	+/-	4,4	27,5	+/-	2,1	39,4	+/-	0,8
Gln	4,8	+/-	1,2	67,4	+/-	3,3	4,0	+/-	0,2	66,4	+/-	0,9
His	3,6	+/-	0,8	73,8	+/-	3,8	3,6	+/-	0,3	73,3	+/-	1,8
Gly	11,5	+/-	1,7	38,9	+/-	4,2	9,1	+/-	0,6	43,4	+/-	2,0
Thr	5,7	+/-	1,2	65,5	+/-	5,8	4,7	+/-	0,2	66,6	+/-	3,2
Cit	3,0	+/-	1,3	70,2	+/-	1,7	2,9	+/-	1,0	61,1	+/-	6,8
Arg	48,9	+/-	6,8	83,4	+/-	0,3	49,8	+/-	4,1	92,8	+/-	0,3
Ala	10,3	+/-	2,2	58,3	+/-	4,3	14,7	+/-	0,9	32,8	+/-	1,3
Tyr	3,1	+/-	1,4	81,5	+/-	8,8	1,9	+/-	0,2	73,1	+/-	1,8
Val	5,3	+/-	2,1	53,9	+/-	18,4	5,4	+/-	0,3	65,5	+/-	0,7
Met	2,4	+/-	0,6	74,4	+/-	7,7	1,9	+/-	0,3	66,5	+/-	1,7
Trp	0,7	+/-	0,3	86,6	+/-	13,6	0,5	+/-	0,0	74,1	+/-	2,4
Phe	2,1	+/-	1,1	62,4	+/-	25,2	2,3	+/-	0,2	72,1	+/-	1,6
Ile	3,5	+/-	1,1	68,3	+/-	12,5	3,5	+/-	0,3	72,6	+/-	1,1
Orn	21,2	+/-	4,1	79,6	+/-	1,9	22,6	+/-	1,2	75,1	+/-	0,7
Leu	8,4	+/-	4,5	79,0	+/-	8,2	5,0	+/-	0,4	69,9	+/-	1,1
Lys	24,4	+/-	3,2	85,5	+/-	0,3	21,6	+/-	1,1	76,8	+/-	1,1
Pro	10,2	+/-	5,9	71,9	+/-	15,9	7,4	+/-	5,3	74,4	+/-	11,9
<b>Gesamt</b>	<b>226,5</b>	<b>+/-</b>	<b>20,0</b>	<b>66,4</b>	<b>+/-</b>	<b>2,9</b>	<b>209,0</b>	<b>+/-</b>	<b>10,6</b>	<b>67,1</b>	<b>+/-</b>	<b>0,5</b>
Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	1											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	5,9	+/-	0,7	46,6	+/-	3,5	5,6	+/-	0,4	54,4	+/-	0,7
Glu	28,3	+/-	5,2	33,0	+/-	7,1	28,9	+/-	0,1	38,3	+/-	1,1
Asn	5,6	+/-	0,7	63,5	+/-	2,1	5,2	+/-	0,3	65,2	+/-	5,3
Ser	31,3	+/-	3,9	42,0	+/-	2,9	30,0	+/-	3,1	45,5	+/-	2,8
Gln	9,8	+/-	2,1	55,6	+/-	2,9	8,8	+/-	0,5	59,7	+/-	2,8
His	3,9	+/-	0,4	75,1	+/-	2,7	4,0	+/-	0,3	77,9	+/-	1,9
Gly	12,2	+/-	1,6	49,6	+/-	2,7	12,4	+/-	1,2	50,2	+/-	3,9
Thr	7,7	+/-	1,0	70,3	+/-	2,7	7,4	+/-	0,2	69,1	+/-	2,8
Cit	2,0	+/-	0,7	84,7	+/-	4,0	2,0	+/-	0,4	82,8	+/-	2,5
Arg	57,0	+/-	16,4	79,9	+/-	9,1	68,3	+/-	3,1	91,5	+/-	1,8
Ala	14,9	+/-	2,3	57,6	+/-	3,0	16,8	+/-	1,2	49,0	+/-	4,9
Tyr	2,9	+/-	0,5	76,8	+/-	1,9	3,1	+/-	0,2	77,6	+/-	4,6
Val	8,4	+/-	1,1	66,3	+/-	0,4	8,3	+/-	0,5	67,9	+/-	3,7
Met	2,2	+/-	0,2	73,3	+/-	3,0	2,4	+/-	0,2	71,5	+/-	4,8
Trp	0,7	+/-	0,1	77,3	+/-	4,8	0,7	+/-	0,0	77,9	+/-	1,8
Phe	3,6	+/-	0,6	73,8	+/-	3,3	3,6	+/-	0,2	76,4	+/-	4,4
Ile	5,6	+/-	0,8	73,1	+/-	2,7	5,6	+/-	0,3	75,2	+/-	4,7
Orn	17,6	+/-	3,3	74,7	+/-	3,3	21,5	+/-	1,7	74,3	+/-	2,1
Leu	7,9	+/-	1,0	72,5	+/-	3,9	7,9	+/-	0,3	75,8	+/-	5,0
Lys	34,9	+/-	8,0	84,0	+/-	4,6	36,8	+/-	0,8	81,9	+/-	2,2
Pro	4,3	+/-	1,1	50,6	+/-	18,4	2,5	+/-	0,3	36,9	+/-	7,7
<b>Gesamt</b>	<b>266,8</b>	<b>+/-</b>	<b>44,8</b>	<b>64,5</b>	<b>+/-</b>	<b>3,4</b>	<b>282,0</b>	<b>+/-</b>	<b>11,0</b>	<b>68,6</b>	<b>+/-</b>	<b>2,6</b>

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	2,1											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	12,0	+/-	0,1	42,6	+/-	5,0	12,0	+/-	1,1	45,3	+/-	2,5
Glu	61,2	+/-	5,9	29,0	+/-	3,0	56,3	+/-	4,9	32,3	+/-	1,4
Asn	9,6	+/-	1,2	72,9	+/-	3,8	9,1	+/-	0,8	73,6	+/-	3,4
Ser	41,2	+/-	3,0	55,3	+/-	3,9	36,3	+/-	3,8	56,3	+/-	4,1
Gln	62,7	+/-	9,3	67,4	+/-	2,2	56,6	+/-	2,5	67,1	+/-	2,7
His	8,2	+/-	0,4	82,1	+/-	1,3	7,6	+/-	0,6	80,9	+/-	1,2
Gly	19,0	+/-	2,5	64,3	+/-	4,6	17,2	+/-	1,4	62,0	+/-	3,5
Thr	14,7	+/-	1,9	76,2	+/-	3,2	13,6	+/-	0,9	74,5	+/-	2,6
Cit	2,1	+/-	0,6	85,8	+/-	1,4	1,8	+/-	0,7	88,2	+/-	2,8
Arg	74,9	+/-	6,3	83,0	+/-	0,2	75,9	+/-	3,7	82,8	+/-	1,5
Ala	24,9	+/-	4,3	75,2	+/-	4,0	23,7	+/-	2,0	69,9	+/-	0,3
Tyr	4,3	+/-	0,5	84,3	+/-	3,0	4,4	+/-	0,6	84,4	+/-	1,1
Val	12,1	+/-	1,7	78,9	+/-	2,9	11,3	+/-	0,8	80,3	+/-	1,4
Met	3,1	+/-	0,3	79,3	+/-	3,8	3,2	+/-	0,6	86,4	+/-	0,6
Trp	1,0	+/-	0,1	84,9	+/-	2,9	1,3	+/-	0,5	89,0	+/-	3,5
Phe	4,8	+/-	0,5	84,3	+/-	4,7	4,9	+/-	0,5	86,7	+/-	1,6
Ile	7,6	+/-	1,0	83,9	+/-	3,2	7,4	+/-	0,6	86,1	+/-	1,4
Orn	36,8	+/-	6,0	84,1	+/-	2,4	35,6	+/-	1,7	79,1	+/-	1,9
Leu	10,4	+/-	1,6	84,9	+/-	3,2	10,5	+/-	0,6	85,7	+/-	1,6
Lys	36,9	+/-	2,3	91,9	+/-	1,4	31,9	+/-	2,0	87,9	+/-	0,6
Pro	4,0	+/-	0,8	47,2	+/-	10,1	3,2	+/-	1,0	45,4	+/-	14,6
<b>Gesamt</b>	<b>452,5</b>	<b>+/-</b>	<b>44,3</b>	<b>68,5</b>	<b>+/-</b>	<b>2,3</b>	<b>424,1</b>	<b>+/-</b>	<b>28,5</b>	<b>68,6</b>	<b>+/-</b>	<b>1,2</b>
Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	3,1											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	10,6	+/-	0,2	38,3	+/-	7,9	11,3	+/-	0,8	37,5	+/-	3,2
Glu	47,7	+/-	1,2	27,2	+/-	2,8	51,7	+/-	3,6	27,4	+/-	2,9
Asn	8,0	+/-	2,0	61,1	+/-	9,1	7,8	+/-	0,4	67,2	+/-	2,1
Ser	35,9	+/-	3,0	55,6	+/-	5,3	36,8	+/-	1,7	60,1	+/-	2,9
Gln	72,2	+/-	3,7	62,0	+/-	5,2	77,7	+/-	6,5	67,6	+/-	0,9
His	8,5	+/-	1,4	74,1	+/-	5,8	8,6	+/-	0,3	77,6	+/-	2,0
Gly	20,5	+/-	3,5	55,9	+/-	3,6	20,9	+/-	0,7	59,2	+/-	3,2
Thr	17,9	+/-	4,2	65,9	+/-	4,8	18,0	+/-	0,2	69,9	+/-	1,2
Cit	2,0	+/-	0,2	81,4	+/-	7,5	1,6	+/-	0,1	77,5	+/-	4,4
Arg	56,2	+/-	2,6	74,5	+/-	15,8	63,7	+/-	2,9	72,2	+/-	1,1
Ala	24,0	+/-	2,9	62,9	+/-	17,7	25,3	+/-	5,1	68,0	+/-	6,3
Tyr	3,5	+/-	1,4	73,6	+/-	4,8	3,4	+/-	0,2	78,1	+/-	3,9
Val	11,7	+/-	3,4	68,8	+/-	10,8	11,7	+/-	0,3	74,6	+/-	1,2
Met	3,0	+/-	0,9	73,6	+/-	16,1	2,8	+/-	0,2	79,4	+/-	5,0
Trp	1,1	+/-	0,5	68,9	+/-	21,9	1,0	+/-	0,1	77,7	+/-	9,6
Phe	4,1	+/-	1,6	71,0	+/-	21,0	3,9	+/-	0,2	79,6	+/-	6,0
Ile	6,5	+/-	2,6	70,4	+/-	16,5	6,5	+/-	0,4	78,1	+/-	3,3
Orn	44,2	+/-	9,1	78,9	+/-	2,1	50,4	+/-	5,6	79,7	+/-	1,4
Leu	8,7	+/-	3,6	71,3	+/-	18,7	8,9	+/-	0,3	80,2	+/-	4,3
Lys	20,3	+/-	7,3	81,6	+/-	8,1	21,9	+/-	1,3	84,1	+/-	2,1
Pro	4,4	+/-	0,9	57,2	+/-	17,4	3,8	+/-	1,2	60,1	+/-	11,0
<b>Gesamt</b>	<b>410,6</b>	<b>+/-</b>	<b>50,1</b>	<b>62,1</b>	<b>+/-</b>	<b>5,7</b>	<b>437,6</b>	<b>+/-</b>	<b>23,2</b>	<b>65,0</b>	<b>+/-</b>	<b>1,5</b>

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	5											
Amino- säure	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär		
Asp	8,9	+/-	2,6	24,9	+/-	21,6	7,8	+/-	2,1	27,0	+/-	13,2
Glu	54,4	+/-	5,1	31,5	+/-	9,4	43,8	+/-	1,8	17,1	+/-	11,3
Asn	7,3	+/-	0,7	65,7	+/-	2,2	5,5	+/-	0,9	52,3	+/-	12,0
Ser	38,5	+/-	9,6	64,4	+/-	9,9	27,5	+/-	5,4	49,7	+/-	8,3
Gln	85,0	+/-	2,9	67,1	+/-	2,1	66,0	+/-	13,3	53,7	+/-	20,6
His	9,3	+/-	0,5	79,9	+/-	2,0	8,3	+/-	0,3	74,0	+/-	6,4
Gly	27,2	+/-	5,6	61,5	+/-	8,2	19,2	+/-	3,2	53,5	+/-	3,5
Thr	21,2	+/-	2,6	69,2	+/-	3,2	17,2	+/-	1,1	63,7	+/-	4,4
Cit	2,8	+/-	0,5	85,1	+/-	2,0	2,1	+/-	0,3	82,6	+/-	1,8
Arg	87,4	+/-	5,6	85,5	+/-	2,9	78,6	+/-	7,7	77,5	+/-	1,2
Ala	32,4	+/-	3,2	67,2	+/-	8,5	30,5	+/-	6,2	27,0	+/-	18,7
Tyr	2,9	+/-	0,8	85,3	+/-	0,5	2,0	+/-	0,5	60,9	+/-	15,4
Val	11,5	+/-	1,8	75,6	+/-	2,9	8,9	+/-	1,4	64,3	+/-	8,4
Met	2,3	+/-	0,1	78,3	+/-	0,5	1,7	+/-	0,5	74,7	+/-	2,9
Trp	0,7	+/-	0,1	83,0	+/-	1,1	0,5	+/-	0,1	75,2	+/-	4,2
Phe	3,1	+/-	0,6	86,4	+/-	0,8	2,2	+/-	0,6	68,0	+/-	8,9
Ile	5,4	+/-	1,0	82,0	+/-	1,2	4,2	+/-	1,0	67,4	+/-	7,9
Orn	49,0	+/-	7,5	84,2	+/-	3,0	45,0	+/-	3,5	79,6	+/-	5,1
Leu	7,0	+/-	1,5	83,9	+/-	0,4	5,5	+/-	1,4	68,1	+/-	8,9
Lys	20,2	+/-	4,0	87,7	+/-	1,6	17,9	+/-	1,3	80,0	+/-	5,6
Pro	4,9	+/-	1,8	71,3	+/-	9,4	3,3	+/-	0,3	40,4	+/-	14,9
<b>Gesamt</b>	483,9	+/-	55,0	69,4	+/-	4,8	397,7	+/-	52,7	58,3	+/-	7,5

-Anhang-

**Tabelle 20 B.** Gesamte Daten eines *downshift*-Experiments mit der Deletionsmutante ME 020 wiederholt bei  $OD_{600}=1,7$ .

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach <i>downshift</i> [h]	0											
Amino- säure	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär		
Asp	17,5	+/-	3,5	54,9	+/-	7,1	18,0	+/-	1,6	55,7	+/-	1,5
Glu	71,2	+/-	11,5	55,9	+/-	6,1	68,2	+/-	4,6	48,8	+/-	4,9
Asn	10,6	+/-	2,5	52,3	+/-	9,2	9,7	+/-	0,9	37,3	+/-	8,8
Ser	34,0	+/-	5,9	50,6	+/-	4,6	35,0	+/-	2,1	52,8	+/-	2,0
Gln	40,2	+/-	8,7	51,5	+/-	4,3	44,9	+/-	2,2	53,3	+/-	6,7
His	11,6	+/-	2,3	80,3	+/-	3,9	11,9	+/-	1,6	79,4	+/-	3,1
Gly	24,3	+/-	4,2	54,0	+/-	4,8	29,0	+/-	2,2	48,3	+/-	3,2
Thr	20,0	+/-	4,3	63,7	+/-	2,9	20,0	+/-	1,3	61,5	+/-	5,1
Cit	6,3	+/-	1,4	79,5	+/-	3,7	8,6	+/-	1,3	78,2	+/-	4,2
Arg	76,2	+/-	12,5	90,5	+/-	1,7	72,1	+/-	9,7	89,7	+/-	2,0
Ala	44,0	+/-	7,2	50,9	+/-	3,6	39,6	+/-	3,7	41,4	+/-	3,2
Tyr	3,4	+/-	0,9	59,5	+/-	7,5	3,2	+/-	0,5	58,3	+/-	8,9
Val	11,5	+/-	2,5	62,7	+/-	5,3	10,3	+/-	0,5	63,7	+/-	5,6
Met	3,0	+/-	0,8	66,3	+/-	9,8	2,8	+/-	0,3	61,2	+/-	12,3
Trp	3,1	+/-	0,4	24,6	+/-	10,6	10,8	+/-	4,8	82,7	+/-	5,5
Phe	3,4	+/-	0,8	60,6	+/-	8,3	2,8	+/-	0,3	59,0	+/-	6,9
Ile	5,5	+/-	1,2	64,1	+/-	8,1	4,9	+/-	0,3	65,4	+/-	5,7
Orn	37,9	+/-	6,9	82,4	+/-	1,9	37,5	+/-	3,2	91,7	+/-	4,3
Leu	7,1	+/-	1,5	61,6	+/-	7,8	6,0	+/-	0,5	64,4	+/-	4,6
Lys	22,9	+/-	5,1	74,1	+/-	5,2	23,6	+/-	1,6	76,6	+/-	11,8
Pro	5,8	+/-	1,1	55,0	+/-	15,2	6,5	+/-	1,7	66,7	+/-	13,1
<b>Gesamt</b>	459,7	+/-	79,6	64,8	+/-	3,9	465,7	+/-	27,9	64,0	+/-	4,6

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	0,5											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	5,5	+/-	1,0	54,1	+/-	2,7	5,6	+/-	0,4	59,9	+/-	6,1
Glu	24,3	+/-	4,3	41,0	+/-	5,6	22,1	+/-	1,8	50,4	+/-	4,3
Asn	9,1	+/-	1,6	65,2	+/-	7,1	9,9	+/-	2,3	55,8	+/-	5,6
Ser	27,8	+/-	3,3	48,1	+/-	2,3	28,5	+/-	1,3	54,7	+/-	1,0
Gln	12,0	+/-	3,1	65,3	+/-	4,7	13,0	+/-	1,1	70,6	+/-	1,0
His	8,1	+/-	1,1	70,1	+/-	0,8	8,8	+/-	0,6	73,6	+/-	2,3
Gly	17,8	+/-	1,5	46,6	+/-	3,6	24,1	+/-	1,8	37,3	+/-	2,9
Thr	10,6	+/-	1,6	62,2	+/-	2,2	10,1	+/-	0,5	66,7	+/-	3,8
Cit	6,6	+/-	1,4	64,1	+/-	6,3	9,0	+/-	0,6	71,2	+/-	1,3
Arg	74,2	+/-	4,7	86,8	+/-	1,9	77,9	+/-	6,2	89,5	+/-	0,4
Ala	17,0	+/-	2,3	71,9	+/-	1,2	13,5	+/-	1,1	64,2	+/-	0,7
Tyr	3,5	+/-	0,7	54,2	+/-	5,4	3,2	+/-	0,2	56,8	+/-	3,0
Val	8,2	+/-	1,1	59,6	+/-	2,6	7,7	+/-	0,3	62,2	+/-	2,6
Met	2,9	+/-	0,5	55,6	+/-	4,2	2,8	+/-	0,3	61,7	+/-	8,1
Trp	3,3	+/-	0,4	20,6	+/-	6,9	14,3	+/-	1,6	85,2	+/-	2,5
Phe	3,3	+/-	0,6	63,8	+/-	1,1	3,0	+/-	0,2	61,0	+/-	6,5
Ile	4,9	+/-	0,6	66,2	+/-	1,5	4,5	+/-	0,2	68,7	+/-	3,9
Orn	32,6	+/-	2,9	78,1	+/-	1,7	37,7	+/-	3,6	86,4	+/-	1,7
Leu	7,4	+/-	1,2	61,3	+/-	2,7	6,4	+/-	0,1	65,7	+/-	4,7
Lys	26,9	+/-	0,8	69,6	+/-	1,2	29,9	+/-	2,3	75,9	+/-	4,0
Pro	4,3	+/-	0,1	53,0	+/-	3,4	6,2	+/-	2,2	60,2	+/-	7,2
<b>Gesamt</b>	<b>310,3</b>	<b>+/-</b>	<b>33,4</b>	<b>66,7</b>	<b>+/-</b>	<b>1,4</b>	<b>338,3</b>	<b>+/-</b>	<b>18,0</b>	<b>71,0</b>	<b>+/-</b>	<b>1,2</b>

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	1											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	7,6	+/-	0,7	57,3	+/-	8,2	7,7	+/-	0,9	57,3	+/-	2,3
Glu	31,6	+/-	1,9	33,4	+/-	4,9	28,8	+/-	1,3	35,7	+/-	1,3
Asn	10,6	+/-	2,2	59,7	+/-	8,1	11,8	+/-	1,1	57,3	+/-	14,7
Ser	30,8	+/-	2,4	42,2	+/-	6,1	28,1	+/-	1,3	48,3	+/-	4,8
Gln	8,7	+/-	1,4	45,4	+/-	4,8	8,8	+/-	0,6	53,0	+/-	4,9
His	6,2	+/-	0,7	68,7	+/-	4,4	6,3	+/-	0,2	72,0	+/-	4,0
Gly	17,5	+/-	3,1	48,4	+/-	7,7	20,4	+/-	0,1	42,0	+/-	5,9
Thr	10,3	+/-	3,1	65,4	+/-	6,4	11,2	+/-	1,0	65,7	+/-	5,6
Cit	4,7	+/-	1,3	75,6	+/-	1,9	5,7	+/-	1,0	73,6	+/-	6,3
Arg	61,3	+/-	5,7	85,0	+/-	4,1	59,7	+/-	2,9	81,9	+/-	1,8
Ala	20,8	+/-	3,2	61,7	+/-	6,0	17,8	+/-	1,5	61,7	+/-	6,1
Tyr	3,8	+/-	0,6	58,2	+/-	11,0	3,8	+/-	0,3	64,1	+/-	5,0
Val	10,0	+/-	1,6	56,6	+/-	9,3	10,4	+/-	1,0	64,2	+/-	6,4
Met	3,0	+/-	0,5	56,9	+/-	12,7	3,1	+/-	0,3	66,6	+/-	3,7
Trp	2,3	+/-	0,4	21,5	+/-	6,1	9,9	+/-	2,2	84,0	+/-	3,7
Phe	3,6	+/-	0,8	63,7	+/-	12,6	3,7	+/-	0,4	69,7	+/-	3,3
Ile	5,8	+/-	1,2	64,9	+/-	10,0	6,2	+/-	0,4	72,1	+/-	3,7
Orn	27,6	+/-	2,5	81,6	+/-	2,7	28,4	+/-	1,4	86,7	+/-	0,4
Leu	8,7	+/-	1,8	61,0	+/-	10,3	9,4	+/-	1,3	71,7	+/-	3,8
Lys	39,1	+/-	0,3	76,2	+/-	7,9	37,6	+/-	1,2	85,0	+/-	1,5
Pro	4,4	+/-	1,0	62,7	+/-	9,7	6,6	+/-	1,4	66,2	+/-	3,0
<b>Gesamt</b>	<b>318,6</b>	<b>+/-</b>	<b>25,1</b>	<b>63,7</b>	<b>+/-</b>	<b>5,1</b>	<b>325,4</b>	<b>+/-</b>	<b>2,0</b>	<b>67,2</b>	<b>+/-</b>	<b>1,8</b>

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	1,5											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	14,7	+/-	2,4	51,4	+/-	8,5	17,4	+/-	2,5	55,2	+/-	7,2
Glu	49,2	+/-	7,4	38,1	+/-	6,0	54,6	+/-	6,4	43,9	+/-	6,9
Asn	17,6	+/-	4,7	68,8	+/-	5,5	19,3	+/-	1,7	66,0	+/-	4,4
Ser	37,2	+/-	5,6	50,8	+/-	5,1	39,5	+/-	3,3	53,1	+/-	3,9
Gln	21,7	+/-	4,3	53,9	+/-	4,4	24,5	+/-	1,5	57,3	+/-	6,4
His	8,3	+/-	1,6	78,2	+/-	5,6	9,9	+/-	0,9	76,7	+/-	2,0
Gly	22,1	+/-	4,9	60,0	+/-	9,4	29,5	+/-	2,3	52,7	+/-	4,6
Thr	16,6	+/-	4,6	73,5	+/-	5,7	19,1	+/-	1,7	70,9	+/-	3,1
Cit	4,4	+/-	0,8	72,2	+/-	6,1	6,2	+/-	1,2	76,8	+/-	5,0
Arg	61,4	+/-	5,7	92,1	+/-	1,5	70,3	+/-	6,1	88,8	+/-	2,0
Ala	29,4	+/-	7,0	66,4	+/-	5,1	28,3	+/-	3,3	63,0	+/-	4,6
Tyr	5,7	+/-	1,5	66,9	+/-	11,6	6,2	+/-	0,9	70,3	+/-	1,9
Val	14,3	+/-	4,9	71,3	+/-	6,9	18,0	+/-	3,7	67,8	+/-	4,3
Met	4,2	+/-	1,3	68,3	+/-	6,8	4,3	+/-	0,4	79,1	+/-	18,2
Trp	2,7	+/-	0,3	30,8	+/-	9,8	8,7	+/-	1,1	75,1	+/-	1,6
Phe	5,6	+/-	1,8	74,6	+/-	7,0	6,1	+/-	0,7	74,7	+/-	3,7
Ile	8,6	+/-	2,7	77,2	+/-	7,4	10,1	+/-	1,5	78,3	+/-	4,2
Orn	28,1	+/-	2,0	81,8	+/-	2,4	34,3	+/-	3,8	86,7	+/-	1,2
Leu	12,8	+/-	4,3	75,4	+/-	6,3	14,9	+/-	2,6	77,7	+/-	3,0
Lys	43,5	+/-	7,0	88,3	+/-	1,1	52,7	+/-	3,5	90,2	+/-	2,7
Pro	6,1	+/-	1,2	58,0	+/-	3,8	13,3	+/-	1,2	70,8	+/-	2,1
<b>Gesamt</b>	<b>414,1</b>	<b>+/-</b>	<b>73,9</b>	<b>68,5</b>	<b>+/-</b>	<b>3,1</b>	<b>487,1</b>	<b>+/-</b>	<b>36,7</b>	<b>69,9</b>	<b>+/-</b>	<b>2,8</b>
Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	2,7											
Aminosäure	Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [µmol/ g BTM]			% vakuolär		
Asp	20,3	+/-	0,5	37,2	+/-	5,8	23,1	+/-	1,5	42,9	+/-	3,5
Glu	70,5	+/-	4,7	33,1	+/-	3,5	74,8	+/-	3,3	33,5	+/-	5,0
Asn	15,7	+/-	2,2	62,6	+/-	4,2	16,7	+/-	1,1	64,4	+/-	3,3
Ser	35,6	+/-	2,1	58,0	+/-	2,9	36,9	+/-	2,5	59,4	+/-	1,4
Gln	60,2	+/-	1,8	64,8	+/-	1,6	68,6	+/-	4,9	66,4	+/-	1,2
His	11,4	+/-	0,3	71,6	+/-	2,0	12,6	+/-	0,8	74,8	+/-	1,0
Gly	30,0	+/-	11,2	52,5	+/-	17,1	29,5	+/-	2,0	52,9	+/-	2,1
Thr	20,8	+/-	0,1	69,2	+/-	1,8	21,6	+/-	0,6	69,0	+/-	1,0
Cit	4,8	+/-	1,1	57,9	+/-	5,1	5,0	+/-	0,1	67,8	+/-	7,4
Arg	58,5	+/-	6,9	84,6	+/-	1,8	60,2	+/-	3,4	82,5	+/-	5,8
Ala	40,0	+/-	0,2	60,5	+/-	3,6	36,9	+/-	1,9	56,5	+/-	1,9
Tyr	4,5	+/-	0,3	56,8	+/-	4,6	5,5	+/-	0,5	64,3	+/-	4,1
Val	13,2	+/-	0,8	62,6	+/-	4,7	14,4	+/-	0,1	67,9	+/-	1,5
Met	3,9	+/-	0,2	61,7	+/-	7,2	4,3	+/-	0,2	64,9	+/-	2,2
Trp	3,8	+/-	0,3	14,6	+/-	2,3	10,6	+/-	1,1	76,4	+/-	1,6
Phe	4,4	+/-	0,5	64,0	+/-	4,8	5,0	+/-	0,3	67,6	+/-	3,8
Ile	6,8	+/-	0,7	64,6	+/-	3,0	7,5	+/-	0,1	70,2	+/-	1,9
Orn	48,4	+/-	1,9	84,4	+/-	2,3	47,4	+/-	7,7	89,8	+/-	1,0
Leu	10,3	+/-	0,5	61,5	+/-	3,3	11,4	+/-	0,7	68,7	+/-	4,1
Lys	30,3	+/-	0,9	71,0	+/-	1,6	33,2	+/-	2,4	81,7	+/-	3,5
Pro	7,4	+/-	0,6	53,9	+/-	7,9	10,3	+/-	4,8	66,4	+/-	12,4
<b>Gesamt</b>	<b>500,8</b>	<b>+/-</b>	<b>25,3</b>	<b>61,5</b>	<b>+/-</b>	<b>2,6</b>	<b>535,3</b>	<b>+/-</b>	<b>28,9</b>	<b>64,3</b>	<b>+/-</b>	<b>2,3</b>

-Anhang-

Stamm	23344c						ME020					
Zeit t nach downshift [h]	4,5											
Amino- säure	Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär			Spezifische Konzentration [ $\mu\text{mol}/$ g BTM]			% vakuolär		
Asp	19,1	+/-	0,6	39,0	+/-	2,8	20,7	+/-	1,5	45,4	+/-	1,9
Glu	77,4	+/-	4,4	37,7	+/-	0,7	68,0	+/-	5,9	39,5	+/-	1,3
Asn	13,0	+/-	6,1	39,0	+/-	34,0	14,9	+/-	1,6	63,5	+/-	2,5
Ser	36,3	+/-	0,2	62,9	+/-	1,0	36,2	+/-	7,1	59,7	+/-	5,6
Gln	87,0	+/-	3,2	66,4	+/-	1,4	91,2	+/-	6,5	67,9	+/-	0,4
His	13,3	+/-	0,1	73,8	+/-	1,3	13,5	+/-	0,8	78,0	+/-	0,4
Gly	47,4	+/-	2,0	42,7	+/-	1,6	32,9	+/-	1,6	54,9	+/-	1,0
Thr	29,8	+/-	0,8	71,1	+/-	1,1	28,7	+/-	2,7	68,5	+/-	1,3
Cit	5,1	+/-	0,5	68,7	+/-	2,9	5,7	+/-	0,4	73,7	+/-	8,3
Arg	73,9	+/-	2,1	85,2	+/-	0,7	63,7	+/-	4,0	89,5	+/-	1,0
Ala	47,0	+/-	1,1	58,7	+/-	2,2	44,1	+/-	3,0	55,3	+/-	0,6
Tyr	4,2	+/-	0,4	57,0	+/-	3,8	4,1	+/-	0,3	62,0	+/-	1,6
Val	15,5	+/-	1,2	66,1	+/-	1,8	15,4	+/-	2,9	67,5	+/-	4,4
Met	4,1	+/-	0,5	56,1	+/-	6,4	6,4	+/-	2,6	42,2	+/-	15,2
Trp	8,6	+/-	9,6	42,5	+/-	38,1	9,4	+/-	1,3	69,5	+/-	2,5
Phe	4,1	+/-	0,2	61,2	+/-	3,7	4,1	+/-	0,8	60,7	+/-	3,6
Ile	6,6	+/-	0,3	64,8	+/-	3,2	6,3	+/-	0,8	65,9	+/-	2,7
Orn	50,2	+/-	13,3	90,2	+/-	1,5	56,5	+/-	4,3	90,1	+/-	1,0
Leu	10,1	+/-	0,5	61,3	+/-	4,7	9,4	+/-	1,8	64,6	+/-	4,5
Lys	31,6	+/-	3,2	63,7	+/-	2,5	25,2	+/-	2,0	82,7	+/-	0,1
Pro	9,2	+/-	4,3	59,0	+/-	14,8	9,0	+/-	3,8	78,4	+/-	7,1
<b>Gesamt</b>	593,7	+/-	14,8	63,1	+/-	0,6	565,4	+/-	42,1	66,5	+/-	0,8

## 7 Literatur

1. **André B. (1997).** An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 1575-1611.
2. **Argüelles J.C. (2000).** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **174**: 217-224.
3. **Asami K., Yonezawa T. (1995).** Dielectric analysis of yeast cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* **1245**: 99-105.
4. **Avéret N., Fitton V., Bunoust O., Rigoulet M., Guerin B. (1998).** Yeast mitochondrial metabolism: from *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Mol. Cell. Biochem.* **184**: 67-79.
5. **Avery S.V., Howlett N.G., Radice S. (1996).** Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependance on plasma membrane fatty acid composition. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3960-3966.
6. **Baba M., Ohsumi M., Scott S.V., Klionsky D.J., Ohsumi Y. (1997).** Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/ lysosome. *J. Cell. Biol.* **139**: 1687-1695.
7. **Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K. (1999).** Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 217-236.
8. **Bechet J., Grenson M., Wiame J.M. (1970).** Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **12**: 31-39.
9. **Bell W., Sun W., Hohmann S., Wera S., Reinders A., DeVirgilio C., Wiemken A., Thevelein J.M. (1998).** Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 3311-3319.
10. **Bertl A., Slayman C.L. (1990).** Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: dependence on calcium, redox state, and voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7824-7828.
11. **Bijkerk A.H.E., Hall R.J. (1977).** A mechanistic model of the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 267-296.

12. **Blomberg A. (2000).** Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 1-8.
13. **Bolard J. (1986).** How do the polyene antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* **864**: 257–304.
14. **Booth J. W., Guidotti, G. (1997).** Phosphate transport in yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* **272**: 20408-20413.
15. **Boy-Marcotte E., Lagniel G., Perrot M., Busereau F., Boudsocq A., Jacquet M., Labarre J. (1999).** The heat shock response in yeast : differential regulation and contributions of the Msn2p/ Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* **33**: 274-283.
16. **Brandriss M.C., Magasanik B. (1979).** Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J. Bacteriol.* **140**: 498-503.
17. **Brandriss M.C., Magasanik B. (1980).** Proline: an essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **143**: 1403-1410.
18. **Brandriss M.C., Krzywicki K.A. (1986).** Amino-terminal fragments of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3502-3512.
19. **Calahorra M., Martínez G.A., Hernández-Cruz A., Pena A. (1998).** Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* **14**: 501-515.
20. **Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. (2001).** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**: 323-337.
21. **Chock P.B., Shacter E., Jurgensen S.R., Rhee S.G. (1985).** Cyclic cascade systems in metabolic regulation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**: 3-12.
22. **Coffman J.A., Cooper T.G. (1997).** Nitrogen GATA factors participate in transcriptional regulation of vacuolar protease genes in *Saccharomyces cerevisia*. *J. Bacteriol.* **179**: 5609-5613.
23. **Cooper T.G. (1982).** Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* (Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R., Eds.), pp. 39-99. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

24. Courchesne WE, Magasanik B. (1983). Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 672-683.
25. Coury L.A., Hiller M., Mathai J.C., Jones E.W., Zeidel M., Brodsky J.L. (1999). Water transport across yeast vacuolar and plasma membrane-targeted secretory vesicles occurs by passive diffusion. *J. Bacteriol.* **181**: 4437-4440.
26. Dang V.-D., Bohn C., Bolotin-Fukuhara M., Daignan-Fornier B. (1996). The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J. Bacteriol.* **178**: 1842-1849.
27. Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1471-1510.
28. de Jesus Ferreira M.C., Bao X., Laizé V., Hohmann S. (2001). Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr. Genet.* **40**: 27-39.
29. Destruelle M., Holzer H., Klionsky D.J. (1995). Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast* **11**: 1015-1025.
30. Dickinson J.R., Schweizer M. (Eds.) (1999). The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Taylor & Francis, London.
31. Dubois E.L., Wiame J.-M. (1978). Catabolic synergism. A cooperation between the availability of substrate and the need for nitrogen in the regulation of arginine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genet.* **164**: 275-283.
32. Dürr M., Boller T., Wiemken A. (1975). Polybase induced lysis of yeast spheroplasts - a new gentle method for preparation of vacuoles. *Arch. Microbiol.* **105**. 319 – 327.
33. Dürr M., Urech K., Boller T., Wiemken A., Schwencke J., Nagy M. (1979). Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* **121**: 169-175.
34. Edskes H.K., Hanover J.A, Wickner R.B. (1999). Mks1p is a regulator of nitrogen catabolism upstream of Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**: 585-594.
35. Entian K.D., Koetter P. (1998). Yeast mutant and plasmid collections. In: Yeast gene analysis (Brown A.J.P., Tuite M.F., Eds.). *Meth. Microbiol.* **26**: 431-449.
36. Estruch F. (2000 ). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 469-486.

37. **Feller A., Ramos F., Piérard A., Dubois E. (1997).** Lys80p of *Saccharomyces cerevisiae*, previously proposed as a specific repressor of *LYS* genes, is a pleiotropic regulatory factor identical to Mks1p. *Yeast* **13**: 1337-1346.
38. **Feller A., Ramos F., Piérard A., Dubois E. (1999).** In *Saccharomyces cerevisiae*, feedback inhibition of homocitrate synthase isoenzymes by lysine modulates the activation of *LYS* gene expression by Lys14p. *Eur. J. Biochem.* **261**: 163-170.
39. **Fiermonte G., Palmieri L., Todisco S., Agrimi G., Palmieri F., Walker J.E. (2002).** Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* epublication ahead of print.
40. **Forsberg H., Ljungdahl P.O. (2001a).** Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane SSy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 814-826.
41. **Forsberg H., Ljungdahl P.O. (2001b).** Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.* **40**: 91-109.
42. **Förster C, Kane P.M.J. (2000).** Cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis is a constitutive function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 38245-38253.
43. **Gancedo J.M. (1998).** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.
44. **Gancedo J.M. (2001).** Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 107-123.
45. **Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4241-4257.
46. **George M.D., Baba M., Scott S.V., Mizushima N., Garrison B.S., Ohsumi Y., Klionsky D.J. (2000).** Agp5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Mol. Biol. Cell* **11**: 969-982.
47. **Goffeau A., Aert R., Agostini-Carbone M.L. et al. (1997).** The yeast genome directory. *Nature* **387** (supplement): 1-105.
48. **Goffeau A., Barrell B.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**: 546, 563-567.

49. **Gombert A.K., Moreira Dos Santos M., Christensen B., Nielsen J. (2001).** Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* **183**: 1441-1451.
50. **Gonzalez B., François J., Renaud M. (1997).** A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**: 1347-1356.
51. **Goossens A., Dever T.E., Pascual-Ahuir A., Serrano R. (2001).** The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 30753-30760.
52. **Gratzfeld-Huesgen A. (1999).** Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysates using the Agilent 1100 series HPLC. Agilent technical note, Agilent technologies, Waldbronn, Deutschland.
53. **Grenson M., Mousset M., Wiame J.M., Bechet J. (1966).** Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* **127**:325-338.
54. **Grundmann O., Mösch H.-U., Braus G.H. (2001).** Repression of *GCN4* mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 25661-25671.
55. **Hamlyn P.F. (1998).** Fungal Biotechnology. *British Mycological Society Newsletter* Mai 1998, The British Mycological Society, Surrey, UK.
56. **Hans M.A., Heinzle E., Wittmann C. (2001).** Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 776-779.
57. **Hardwick J.S., Kuruvilla F.G., Tong J.K., Shamji A.F., Schreiber S.L. (1999).** Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signalling pathways directly controlled by the Tor-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14866-14870.
58. **Harter, C. und Reinhard, C. (2000).** The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell. Biochem.* **34**: 1-38.
59. **Hinnebusch A.G. (1988).** Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
60. **Hinnebusch A.G. (1997).** Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**: 21661-21664.

61. **Hohmann S. (2002).** Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *Int. Rev. Cytol.* **215**: 149-187.
62. **Holmes A.R., McNaughton G.S., More R.D., Sepherd M.G. (1991).** Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: a <sup>13</sup>N isotope study. *Can. J. Microbiol.* **37**: 226-232.
63. **Honigberg S.M., Lee R.H. (1998).** Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4548-4555.
64. **Hottiger T., De Virgilio C., Hall M.N., Boller T., Wiemken A. (1994).** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **219**: 187-193.
65. **Hounsa C.-G., Brandt E.V., Thevelein J., Hohmann S., Prior B.A. (1998).** Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* **144**: 671-680.
66. **Indge K.J.(1968).** Polyphosphate of the yeast cell vacuole. *J. Gen. Microbiol.* **51**:447-455.
67. **Jauniaux J.C., Urrestarazu L.A., Wiame J.M. (1978).** Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *J. Bacteriol.* **133**: 1096-1107.
68. **Jones, E.W. Webb G.C. and Hiller M.A. (1997).** Biogenesis of function of the yeast vacuole". in "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*". vol 3 ,. 363-470, Cell Cycle and Cell Biology. Ed. J.R. Pringle, J.R. Broach, E.W. Jones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
69. **Jones K.D., Kompala D.S. (1999).** Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *J. Biotechnol.* **71**: 105-131.
70. **Jones P.M., George A.M. (2000).** Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC-transporters. What goes around comes around. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5298-5305.
71. **Kakinuma Y., Ohsumi Y., Anraku Y. (1981).** Properties of H<sup>+</sup>-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**: 10859-10863.

72. **Kakinuma Y., Masuda N., Igarashi K. (1992).** Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**: 126-130.
73. **Keenan K.A., Weiss R.L. (1997).** Characterization of vacuolar arginine uptake and amino acid efflux in *Neurospora crassa* using cupric ion to permeabilize the plasma membrane. *Fungal Genet. Biol.* **22**: 177-190.
74. **Keller F., Schellenberg M., Wiemken A. (1982).** Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* **131**: 298-301.
75. **Kitajima Y., Sekiya T., Nozawa Y. (1976).** Freeze-fracture ultra-structural alterations induced by filipin, pimaricin, nystatin and amphotericin B in the plasma membranes of *Epidermophyton*, *Saccharomyces* and red blood cells. A proposal of models for polyene-ergosterol complex-induced membrane lesions. *Biochim. Biophys. Acta* **445**: 452-465.
76. **Kitamoto K., Yoshizawa K., Ohsumi Y., Anraku Y. (1988).** Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170**: 2683-2686.
77. **Klionsky D.J., Herman P.K., Emr S.D. (1990).** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54**: 266-292.
78. **Köhler W., Schachtel G., Voleske P. (1996).** Biostatistik, 2. Auflage Springer, Berlin.
79. **Krallish I., Jeppsson H., Rapoport A., Hahn-Hägerdahl B. (1997).** Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 447-451.
80. **Krzywicki K.A., Brandriss M.C. (1984).** Primary structure of the nuclear *PUT2* gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2837-2842.
81. **Kuruvilla F.G., Shamji A.F., Schreiber S.L. (2001).** Carbon- and nitrogen-quality signalling to translation are mediated by distinct GATA-type transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7283-7288.
82. **Kuruvilla F.G., Shamji A.F., Sternson S.M., Hergenrother P.J., Schreiber S.L. (2002).** Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays. *Nature* **416**: 653-657.

83. **Laizé V., Tacnet F., Ripoche P., Hohmann S. (2000).** Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins. *Yeast* **16**: 897-903.
84. **Larsson C., Pahlman I.L., Gustafsson L. (2000).** The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 797-809.
85. **Latterich M., Watson M.D. (1991).** Isolation and characterization of osmosensitive vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2417-2426.
86. **Lillie S.H., Pringle J.R. (1980).** Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
87. **Lindroth P., Mopper K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674.
88. **Litters N., Schmelzeisen-Redeker (1989).** Experience with fast HPLC in the routine analytical laboratory., *GIT* **33**: 81-83.
89. **Londesborough J., Varimo K. (1984).** Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* **219**: 511-518.
90. **Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., Thevelein J.M., Hohmann S. (1995).** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* **14**: 1360-1371.
91. **Maaheimo H., Fiaux J., Çakar Z.P., Bailey J.E., Sauer U., Szyperski T. (2001).** Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional <sup>13</sup>C labelling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2464-2479.
92. **Magasanik B. (1992).** Regulation of nitrogen utilization. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression (Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R., Eds.), pp. 283-317. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
93. **Matile P., Wiemken A. (1967).** The vacuole as the lysosome of the yeast cell. *Arch. Mikrobiol.* **56**: 148-155.
94. **Messenguy F., Colin D., ten Have J.P. (1980).** Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**: 439-447.

95. **Messenguy F., Vierendeels F., Scherens B., Dubois E. (2000).** In *Saccharomyces cerevisiae*, expression of arginine catabolic genes *CAR1* and *CAR2* in response to exogenous nitrogen availability is mediated by the Ume6 (CargRI)-Sin3 (CargRII)-Rpd3 (CargRIII) complex. *J. Bacteriol.* **182**: 3158-3164.
96. **Mittenbühler K., Holzer H. (1988).** Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J. Biol. Chem.* **263**: 8537-8543.
97. **Nass R., Rao R. (1999).** The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145**: 3221-3228.
98. **Nelissen B., DeWachter R., Goffeau A. (1997).** Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 113-134.
99. **Nwaka S., Mechler B., Destruelle M., Holzer H. (1995).** Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* **360**: 286-290.
100. **Nwaka S., Mechler B., Holzer H. (1996).** Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS lett.* **386**: 235-238.
101. **Ohnishi T., Gall R.S., Mayer M.L. (1975):** An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: application to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine. *Anal. Biochem.* **69**: 261-267.
102. **Ohsumi Y., Anraku Y. (1981).** Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**: 2079-2082.
103. **Ohsumi Y., Kitamoto K., Anraku Y. (1988).** Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* **170**: 2676 - 2682.
104. **Parrou J.-L., Brice E., Plourde L., Bauche A., Gonzalez B., François J. (1999).** Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 191-203.
105. **Patthy M., Balla T., Aranyi P. (1990).** Reversed phase ion pair study of myoinositol phosphates. *J. Chromatogr.* **523**: 201-216.
106. **Palmieri L., De Marco V., Iacobazzi V., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. (1997).** Identification of the yeast *ARG11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS lett.* **410**: 447-451.

107. **Palmieri L., Pardo B., Lasorsa F.M., del Arco A., Kobayashi K., Iijima M., Runswick M.J., Walker J.E., Saheki T., Satrustegui J., Palmieri F. (2001).** Citrin and aralar1 are Ca<sup>2+</sup>-stimulated aspartate/ glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J.* **20**: 5060-5069.
108. **Parrou J.-L., Enjalbert B., Plourde L., Bauche A., Gonzalez B., François J. (1999).** Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 191-203.
109. **Pascual-Ahuir A., Serrano R., Proft M. (2001).** The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 16-25.
110. **Paulsen I.T., Sliwinski M.K., Nelissen B., Goffeau A., Saier Jr. M.H. (1998).** Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* **430**: 116-125.
111. **Petrovic S., Pascolo L., Gallo R., Cupelli F., Ostrow J.D., Goffeau A., Tiribelli C., Bruschi C.V. (2000).** The products of *YCF1* and *YLL015w (BPT1)* cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 561-571.
112. **Posas F., Chambers J.R., Heyman J.A., Hoeffler J.P., de Nadal E., Ariño J. (2000).** The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* **275**: 17249-17255.
113. **Price N.P.J., Firmin J.L., Gray D.O. (1992).** Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **598**: 51-57.
114. **Reed R.H., Chudek J.A., Foster R., Gadd G.M. (1987).** Osmotic significance of glycerol accumulation in growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2119-2123.
115. **Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann S. (2000).** The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **275**: 8290-8300.
116. **Roberg K.J., Rowley N., Kaiser C. (1997).** Physiological regulation of membrane protein sorting late in secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **137**: 1469-1482.
117. **Russnak R., Konczal D., McIntire S.L. (2001).** A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* **276**: 23849-23857.

118. **Sato T., Ohsumi Y., Anraku Y. (1984a)**. Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/ amino acid antiport systems. *J. Biol. Chem.* **259**: 11505-11508.
119. **Sato T., Ohsumi Y., Anraku Y. (1984b)**. An arginine/ histidine exchange transport system in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11509-11511.
120. **Schimz K.L., Rütten B., Tretter M. (1981)**. Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* **1**:457-462.
121. **Schneider R., Brügger B., Sandhoff R., Zellnig G., Leber A., Lampl M., Athenstaedt K., Hrastnik C., Eder S., Daum G., Paltauf F., Wieland F.T., Kohlwein S.D. (1999)**. Electrospray ionisation tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **146**: 741-754.
122. **Schuster R. (1988)**. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **431**: 271-284.
123. **Scott S.V., Hefner-Gravink A., Morano K.A., Noda T., Ohsumi Y., Klionsky D.J. (1996)**. Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12304-12308.
124. **Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., de Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R., Montesinos C. (1999)**. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* **50**: 1023-1036.
125. **Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986)**. Laboratory course manual for methods in Yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
126. **Shima J., Hino A., Yamada-Iyo C., Suzuki Y., Nakajima R., Watanabe H., Mori K., Takano H. (1999)**. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2841-2846.

127. **Sinclair K., Warner J.P., Bonthron D.T. (1994).** The *ASPI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isoenzyme of L-asparaginase. *Gene* **144**: 37-44.
128. **Singer M.A., Lindquist S. (1998).** Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.* **1**: 639-648.
129. **Simola M., Hanninen A.L., Stranius S.M., Makarow M. (2000).** Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for the maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Mol. Microbiol.* **37**: 42-53.
130. **Sivadon P., Peypouquet M.F., Doignon F., Aigle M., Crouzet M. (1997).** Cloning of the multicopy suppressor gene *SUR7*: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast* **13**: 747-761.
131. **Sóberon M., González A. (1987).** Physiological role of glutaminase activity in *Saccaromyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1-8.
132. **Soetens O., Crabeel M., El Moulidj B., Duyckaerts C., Sluse F. (1998).** Transport of arginine and ornithine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **258**: 702-709.
133. **Sola-Penna M., Meyer-Fernandes J.R. (1998).** Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* **360**: 10-40.
134. **Sumrada R., Cooper T.G. (1978).** Basic amino acid inhibition of cell division and macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **108**: 45-56.
135. **ter Schure E.G., Silljé H.H.W., Vermeulen E.E., Kalthorn J.W., Verkleij A.J., Boonstra J., Verrips C.T. (1998).** Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144**: 1451-1462.
136. **ter Schure E.G., van Riel N.A.W., Verrips C.T. (2000).** The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.***24**: 67-83.
137. **Thomas A.H., Newland P., Sharma N.R. (1982).** The heterogeneous composition of pharmaceutical-grade nystatin. *Analyst* **107**: 849-854.
138. **Thomas B.J., Rothstein R.J. (1989).** Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630.

139. **Thumm M. (2000).** Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc. Res. Tech.* **51**, 563-572.
140. **Trotter E.W., Berenfeld L., Krause S.A., Petsko G.A., Gray J.V. (2001).** Protein misfolding and temperature up-shift cause G<sub>1</sub> arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7313-7318.
141. **Tsvetkova N.M. Phillips B.L., Crowe L.M., Crowe J.H., Risbud S.H. (1998).** Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid state <sup>31</sup>P NMR and FTIR studies. *Biophys. J.* **75**: 2947-2955.
142. **Urech K., Dürr M., Boller T., Wiemken A., Schwencke J. (1978).** Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **116**: 275-278.
143. **van Riel N.A.W. (2000).** A cybernetic modelling approach for cell biology. Case study of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Utrecht/ Niederlande.
144. **Verduyn C, Postma E, Scheffers W.A., Van Dijken J.P.(1992).** Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**: 501-517.
145. **Visser W., van Spronsen E.A., Nanninga N., Pronk J.T., Kuenen J.G., van Dijken J.P. (1995).** Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**: 243-53.
146. **Wada Y., Anraku Y. (1994).** Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 631-637.
147. **Weinand M. (2001).** Biochemische und biotechnologische Charakterisierung von Carriermutanten in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
148. **Wiame J.-M., Grenson M., Arst H.N. (1985).** Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microbial Physiol.* **26**: 1-87.
149. **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 lett.* **464**: 123-128.

150. **Wiemken A., Nurse P. (1973).** Isolation and characterization of the amino acid pools located within the cytoplasm and vacuoles of *Candida utilis*. *Planta (Berl.)* **109**: 293-306.
151. **Wiemken A., Dürr M. (1974).** Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **101**: 45-57.
152. **Wiemken A. (1975).** Isolation of vacuoles from Yeasts. *Meth. Cell. Biol.* **12**: 99-109.
153. **Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
154. **Young G.B., Jack D.L., Smith D.W., Saier Jr. M.H. (1999).** The amino acid/ auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 306-322.
155. **Zinser E., Sperka-Gottlieb C.D.M., Fasch E.V., Kohlwein S.D., Paltauf F., Daum G. (1991).** Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 2026 – 2034.

---

## Lebenslauf

- 17.10.1969      Geboren in Ilshofen
- 1977-1980      Grundschule Ilshofen
- 1980-1989      Albert-Schweitzer-Gymnasium, Crailsheim  
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife
- 1991-1994      Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1994-1995      Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1996-1998      Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Abschluß als Diplom Biochemiker
- 1997-1998      Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiochemie der Universität Tübingen  
bei Prof. Dr. H. Ninnemann:  
„Studien zu einer möglichen NO-Synthaseaktivität in den Pilzen  
*Phycomyces blakesleeanus* und *Neurospora crassa*“
- 1999-2002      Promotion am Institut für Biochemie der Universität zu Köln bei Prof.  
Dr. R. Krämer:  
„Untersuchung subzellulärer Metabolitverteilungen in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae*“

## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer betreut worden.

Köln, 29.04.2002

Keine Teilpublikationen